

Einfluss neuer Acetylcholinesterasehemmer auf die durch Scopolamin reduzierte kognitive Leistung der Ratte

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Michel Sachs

geboren am 04.10.1982 in Schmalkalden

Gutachter

1. Prof. Dr. Christian Fleck, Jena
2. PD Dr. Andreas Seeling, Jena
3. Prof. Dr. Michael Decker, Würzburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.02.2013

Meinem Großvater

Dietrich Fölsch

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	4
2.	Zusammenfassung	6
3.	Einleitung.....	8
3.1	Morbus Alzheimer	8
3.1.1	Demenz	8
3.1.2	Epidemiologie	9
3.1.3	Morphologische Kennzeichen des Morbus Alzheimer.....	9
3.1.3.1	Senile Plaques	9
3.1.3.2	Neurofibrilläre Bündel (NFT).....	10
3.1.4	Risikofaktoren.....	10
3.1.4.1	Alter	10
3.1.4.2	Geschlecht.....	11
3.1.4.3	Genetische Disposition	11
3.1.4.4	Sonstige Risikofaktoren	12
3.1.4.4.1	Kardiovaskuläre Risikofaktoren	12
3.1.4.4.2	Alkohol- und Tabakkonsum	12
3.2	Pathogenese des Morbus Alzheimer	13
3.2.1	Amyloid-Kaskaden- und Tau-Hypothese	13
3.2.2	Oxidativer Stress, Inflammation und vaskuläre Dysfunktion.....	14
3.2.3	Integrative Modelle der Alzheimer-Pathogenese	14
3.3	Die cholinerge Hypothese.....	15
3.3.1	Das cholinerge System.....	15
3.3.2	Acetylcholin und Gedächtnis.....	16
3.3.3	Cholinerges Defizit	17
3.3.4	Cholinerge Hypothese, β -Amyloid und neurofibrilläre Tangles in Wechselbeziehung	17
3.4	Therapie des Morbus Alzheimer.....	19
3.4.1	Medikamentöse Therapie mit nachgewiesener Wirksamkeit	19
3.4.2	Cholinomimetika - Bedeutung der Acetylcholinesteraseinhibitoren.....	19

3.4.3	Alternative Therapieoptionen bei Morbus Alzheimer	21
3.5	Working memory, Radial Maze und Scopolaminmodell	22
4.	Zielstellung der Arbeit.....	24
5.	Material und Methoden.....	26
5.1	Versuchstiere	26
5.2	Chemikalien	26
5.2.1	Scopolamin	26
5.2.2	Tacrin	27
5.2.3	Versuchssubstanzen	27
5.3	Messeinrichtung.....	29
5.4	Methode	30
5.4.1	Training.....	31
5.4.2	Versuchsläufe.....	32
5.4.2.1	Wirkung von Scopolamin und Tacrin an der Ratte	32
5.4.2.2	Wirkung der neuen Testsubstanzen	32
5.5	Statistische Auswertung.....	33
6.	Ergebnisse.....	34
6.1	Ermittlung der Dosis und des Applikationszeitpunktes von Tacrin	34
6.2	Wirkungen der neu synthetisierten Tacrinderivate	37
6.2.1	<i>In vitro</i> -Aktivität und Selektivität.....	37
6.2.2	Wirkungen der neuen Substanzen <i>in vivo</i> - Betrachtung der Fehler und Laufzeit	37
6.2.2.1	FL16 und FL98	37
6.2.2.2	FL38.....	40
6.2.2.3	FL99 und NO-Donator.....	40
6.2.2.4	Vergleich von FL99, NO-Donator und FL38	45
6.2.2.5	Zusammenfassende Darstellung der Wirkung von Tacrin, FL16, FL38 und FL98	45
6.2.2.6	FL15.....	48
6.3	Hepatotoxizität - Vergleich der NO-Tacrinderivate FL16 und FL38 mit Tacrin	50

7.	Diskussion	52
7.1	ZNS-Gängigkeit von Scopolamin und Tacrin	52
7.2	Bedeutung der Lipophilie für die Überwindung der Bluthirnschranke (BHS)	53
7.3	ZNS-Gängigkeit der neuen Substanzen	54
7.4	Pleiotrope Wirkungen der Tacrinderivate.....	56
7.5	NO-Derivate.....	61
7.5.1	Wirkung von NO	61
7.5.2	FL99 + NO-Donator	63
7.5.3	NO-Tacrinderivate	64
7.6	Tacrin-Ferulasäure-Hybrid FL15.....	67
7.7	Hepatotoxizität von FL16 und FL38	69
8.	Schlussfolgerungen	71
9.	Literaturverzeichnis	72
10.	Ehrenwörtliche Erklärung.....	99
11.	Danksagung	100
12.	Lebenslauf.....	101

1. Abkürzungsverzeichnis

A β	Beta-Amyloid
ACh.....	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AChR	Acetylcholinrezeptor
AD.....	Alzheimer Demenz
AGE	Advanced glycation endproducts
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid precursor protein
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
AUC	area under the curve
BACE.....	beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme
BHS.....	Bluthirnschranke
BuChE.....	Butyrylcholinesterase
CDT	Clock drawing test
ChAT	Cholinacetyltransferase
ChE	Cholinesterase
cGMP	cyclic Guanosinmonophosphat
Da.....	Dalton
EOAD	early-onset Alzheimer's disease
EOFAD	early-onset familial Alzheimer's disease
FAD	familial Alzheimer's disease
GABA	γ -Aminobuttersäure
GTN	Glyceroltrinitrat
H ⁺	Wasserstoffion
HWZ	Halbwertszeit
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
i. p.	intraperitoneal
KM.....	Körpermasse
LDH	Laktatdehydrogenase
LOAD	late-onset Alzheimer's disease

LTP	Long term potentiation
mAChR	muscarinerger Acetylcholinrezeptor
MCI.....	mild cognitive impairment
MG	Molekulargewicht
MMSE.....	Mini-mental status examination
MTDL	Multi-Target-Directed Ligands
nAChR	nicotinerger Acetylcholinrezeptor
NFT	neurofibrillary tangles
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PAS	peripheral anionic site
PHF	paired helical filaments
PS	permeability surface
ROS.....	Reactive oxygen species
sGC	soluble Guanylatzyklase
SOP	standard operating procedure
WHIMS.....	Women's Health Initiative Memory Study

2. Zusammenfassung

Die Alzheimer Demenz (AD) ist mit über 50% die häufigste Demenzform. Bis heute gelang es nicht, die Pathogenese dieser neurodegenerativen Erkrankung vollständig zu klären. Nach der cholinergen Hypothese stellt ein Acetylcholin-(ACh)-Mangel, welcher aus einem Neuronen- und Synapsenverlust im cholinergen System resultiert, den Beginn dieser multifaktoriellen Erkrankung dar. Außerdem scheint eine zerebrale Minderperfusion bei der AD bedeutsam zu sein.

Gegenwärtig gibt es keine effektive medikamentöse Therapie, die den Ausbruch oder die Progression der AD aufhalten kann. Aufgrund der Komplexität der Erkrankung versucht man Medikamente zu entwickeln, die gleichzeitig unterschiedliche Therapieziele verfolgen (Multi-Target-Directed Ligands = MTDL).

Tacrin ist ein reversibler Cholinesterase-Hemmstoff, der die Kognition bei Vorliegen eines cholinergen Defizites verbessern kann. Wegen seiner Hepatotoxizität wurde es jedoch in vielen Ländern vom Markt genommen. Auf der Suche nach neuen AD-Medikamenten, die die Kognition verbessern, aber geringere Nebenwirkungen haben, wurden fünf Tacrinderivate und ein Alkylnitrat (NO-Donator) synthetisiert. Bei drei der fünf neuen Substanzen (FL16, FL38 und FL98) handelte es sich um Alkylendiamin-gekoppelte NO-Tacrin-Hybride, während bei den anderen beiden Substanzen eine Hybridisierung von Tacrin und Ferulasäure (FL15), oder eine bloße Kopplung der Alkylendiamin-Seitenkette mit einem Tacrinrest (FL99) vorliegt. Sowohl von NO als auch von Ferulasäure sind hepatoprotektive Wirkungen bekannt.

Es wurde untersucht, ob die neuen Substanzen die Scopolamin-bedingte Beeinträchtigung des Arbeitsgedächtnisses der Ratte im 8-Arm-Radial Maze im Vergleich zu Tacrin genauso oder möglicherweise noch besser antagonisieren können.

Zudem wurden zwei der drei NO-Tacrin-Hybride (FL16 und FL38) in Bezug auf ihre Hepatotoxizität (ASAT, LDH, Albumin und Histologie) untersucht.

In vitro konnte zunächst für alle neuen Tacrinderivate eine mit Tacrin vergleichbare ChE-Hemmung nachgewiesen werden. *In vivo* riefen jedoch nur die NO-Tacrin-Hybride (FL16, FL38 und FL98) eine signifikante Kognitionsverbesserung hervor. Dabei zeigte sich kein wesentlicher Unterschied bei Amid- und Amin-gekoppelten NO-Tacrin-Hybriden. Die gegenüber der Scopolamin-Gruppe verminderte Fehlerzahl, die

verkürzten Laufzeiten sowie die höhere Anzahl fehlerfrei gefressener Pellets pro Sekunde spiegeln die kognitionsverbessernde Wirkung der NO-Tacrin-Hybride wider.

Da der Nitratester von FL99, das NO-Tacrin-Hybrid FL38, im Gegensatz zur kombinierten Gabe von FL99 mit dem NO-Donator die Kognition im Scopolamin-Paradigma verbessert, ist zu vermuten, dass die Kopplung des Nitratrestes mit der Alkylendiamin-Seitenkette entscheidend für die Wirksamkeit der neuen Tacrinderivate *in vivo* zu sein scheint.

Die kognitionsverbessernde Wirkung der neuen NO-Tacrin-Hybride wäre außerdem durch vasodilatierende Effekte sowie eine Wechselwirkung des Nitratrestes mit der PAS der AChE möglich. Zudem soll auch NO selbst an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt sein. Eine Verbesserung der zerebralen Perfusion sowie eine verminderte Bildung von Beta-Amyloid (A β) durch die Wechselwirkung mit der PAS könnten möglicherweise sogar lang anhaltende kognitionsverbessernde Wirkungen nach Gabe von FL16, FL38 und FL98 hervorrufen.

FL16 und FL38 waren im Gegensatz zu Tacrin nicht hepatotoxisch, was sich durch die antioxidative und antiapoptotische Wirkung der beiden NO-Tacrin-Hybride begründen lässt. Es ist zu vermuten, dass FL16 und FL38 als MTDL wirksam sein könnten, wobei ihre fehlende Hepatotoxizität ein Vorteil gegenüber Tacrin darstellt. Für eine endgültige Bewertung der Substanzen wären ergänzende Untersuchungen (Auswirkungen auf die Bildung von A β bei Knockout-Tieren, Bindungsstudien im Gehirn etc.) erforderlich, um ihre Eignung zur Behandlung von AD-Patienten abschließend beurteilen zu können.

3. Einleitung

3.1 Morbus Alzheimer

Vor etwa 100 Jahren berichtete Alois Alzheimer auf einem Kongress in Tübingen über den ersten Fall einer Krankheit, die später von dem deutschen Psychiater Emil Kraepelin als Alzheimer Demenz (AD) bezeichnet wurde (Gottfries 1988). In einer 1907 über diesen Fall veröffentlichten Arbeit beschreibt Alzheimer bei einer 51-jährigen Patientin eine Gedächtnisstörung, aber auch neuropathologische Veränderungen, die als senile Plaques und neurofibrilläre Bündel (engl.: neurofibrillary tangles = NFT) bezeichnet werden (Weis 1997). Sie gelten heute als Kennzeichen der AD (Blennow et al. 2006). Insgesamt waren Alzheimer zu seinen Lebzeiten nur zwei Fälle dieser Erkrankung bekannt (Haass 1999). Im Gegensatz zu dem Begriff „Demenz“, der lediglich ein klinisches Syndrom darstellt, ist Morbus Alzheimer eine Erkrankung mit neuropathologischer Entität (Eschweiler et al. 2010). Die Neurodegeneration, Ursache dieser bis heute nicht heilbaren Erkrankung, beginnt dabei teilweise schon 20-30 Jahre vor dem Auftreten der ersten Symptome (Blennow et al. 2006). Im Verlauf der AD bleibt das implizite Gedächtnis weitestgehend erhalten (Machado et al. 2009). Es lassen sich jedoch vermindertes Entscheidungs- und Urteilsvermögen sowie eingeschränkte Orientierung beobachten (Blennow et al. 2006). Diagnostische Methoden zur Früherkennung leichter AD bzw. des „mild cognitive impairment“ (MCI) (Reisberg et al. 2008) bietet die Mini-mental status examination (MMSE) = Folsteintest und der Clock Drawing Test (CDT) (Eschweiler et al. 2010).

3.1.1 Demenz

Nach ICD 10-Definition ist Demenz die Folge einer meist chronischen oder fortschreitenden Erkrankung des Gehirns mit Beeinträchtigung von kortikalen Funktionen (z. B. Gedächtnis, Orientierung, Auffassung, Rechnen, Lernfähigkeit und Sprache), jedoch ohne Bewusstseinstörung. Teilweise zeigen sich auch Veränderungen des Sozialverhaltens, der Motivation und der emotionalen Kontrolle. Für die Diagnosestellung „Demenz“ muss eine entsprechende Symptomatik über mindestens 6 Monate bestanden haben (S3-Leitlinie 2009).

3.1.2 Epidemiologie

Da der Anteil älterer Menschen in der Bevölkerung wächst, steigt auch die Prävalenz von dementiellen Syndromen. Man geht davon aus, dass sich die Zahl der Demenzerkrankungen etwa alle 20 Jahre verdoppeln wird (Ferri et al. 2005). Die häufigste Form der Demenz ist mit über 50 Prozent die AD (Blennow et al. 2006), gefolgt von Demenzen, die auf vaskuläre Faktoren zurück zu führen sind (Battistin und Cagnin 2010). Während 2005 weltweit etwa 24 Millionen Menschen von Demenz betroffen waren (Ferri et al. 2005), wurde die Zahl der Demenzerkrankungen 2010 bereits auf über 35 Millionen geschätzt (Wimo und Prince 2010). Holtzman et al. (2011) gehen dabei allein von 30 Millionen AD-Erkrankten aus, was jedoch weitaus mehr als 50% aller Demenzen bedeuten würde. Je nach Erkrankungsbeginn, spricht man von einer early-onset (EOAD < 65 Jahre) - bzw. late-onset Form (LOAD > 65 Jahre) (Williamson et al. 2009). Ätiologisch wird zwischen einer selteneren familiären (FAD) - und einer häufigeren sporadischen Form unterschieden (Blennow et al. 2006).

3.1.3 Morphologische Kennzeichen des Morbus Alzheimer

Pathologische Kennzeichen dieser irreversibel verlaufenden Erkrankung (Kar 2002) sind neben senilen Plaques und NFT, eine Synapsen- und Neuronendegeneration (Zilka et al. 2006) sowie eine Atrophie des Hippocampus (van de Pol et al. 2006) und des medialen Temporallappens (Jacobs et al. 2011). Senile Plaques und NFT finden sich vorrangig im entorhinalen Cortex sowie im Hippocampus und im medialen Temporallappen (Appel et al. 2009).

3.1.3.1 Senile Plaques

Senile Plaques sind überwiegend in Bereichen extensiver Neurodegeneration zu finden (Kar 2002). Sie können sich aber auch in den Blutgefäßen des Gehirns ablagern (Haass et al. 1992). Senile Plaques bestehen größtenteils aus dystrophischen Neuronen, Beta-Amyloid (A β), Mikroglia und Astrozyten. Darüber hinaus enthalten sie geringe Mengen an Komponenten der Komplementkaskade, Apolipoprotein E (ApoE), α 1-Antichymotrypsin, lysosomale Proteasen und Antioxidationsenzyme (Kar 2002).

Die extrazellulär gelegenen Peptide des A β (Haass et al. 1992) bestehen aus einer fibrillären (A β -42) und einer nicht-fibrillären Komponente (A β -40) (Kar 2002). A β entsteht durch die proteolytische Spaltung des Amyloid precursor proteins (APP) unter Betei-

ligung von β -Sekretasen (BACE) und γ -Sekretasen (Presenilin) (Steiner et al. 1999) und wird vorwiegend in den cholesterinreichen Arealen der Zellmembran beobachtet (Nemec und Schubert-Zsilavec 2002).

3.1.3.2 Neurofibrilläre Bündel (NFT)

Die für die AD pathognomonischen (Rosenthal und Khotianov 2003), aus gepaarten helikalen hyperphosphorylierten Tau-Proteinen (PHF) bestehenden NFT (Iqbal et al. 2010) lagern sich überwiegend im Hippocampus, im Assoziationscortex, in der Amygdala und in subcorticalen Kernen ab (Kar 2002). Sie können in dystrophischen Neuronen aggregieren und sowohl innerhalb als auch außerhalb der senilen Plaques liegen (Kar 2002). Man beobachtet NFT jedoch auch bei anderen Erkrankungen, die ohne Amyloid-Ablagerung einhergehen (Kar 2002). Die Tau-Phosphorylierung wird wahrscheinlich durch die Anwesenheit von A β beeinflusst (Rosenthal und Khotianov 2003). Im Gegensatz zum A β liegt eine positive Korrelation zwischen der Menge an NFT mit dem Schweregrad der AD vor (Kar 2002).

3.1.4 Risikofaktoren

Risikofaktoren, die im ursächlichen Zusammenhang mit der AD diskutiert werden, betreffen:

- Alter,
- Geschlecht,
- genetische Disposition und
- sonstige Risikofaktoren

3.1.4.1 Alter

Hohes Lebensalter stellt den schwerwiegendsten Risikofaktor für die sporadische AD dar (Drachman 2006). Beträgt die Prävalenz aller Demenzen unterhalb des 65. Lebensjahres weniger als 1% (Blennow et al. 2006), so zeigt sie von da ab einen exponentiellen Anstieg, welcher auch die AD-Prävalenz betrifft (Kawas und Corrada 2006). Während bei den über 65-Jährigen etwa 7% an AD leiden (Kar 2002), liegt dieser Anteil in der Population der über 85-Jährigen in der westlichen Welt zwischen 24% und 33% (Blennow et al. 2006). Laut Drachman (2006) ist in dieser Altersgruppe etwa die Hälfte der Gesamtpopulation von der sporadischen AD betroffen.

3.1.4.2 Geschlecht

Frauen sind häufiger betroffen als Männer (Barranco-Quintana et al. 2005) und zeigen einen früheren Krankheitsausbruch (Jung et al. 2008). Nach der Menopause ist ein Abfall kognitiver Funktionen zu beobachten (Markou et al. 2005), zudem wird dem postmenopausal verminderten, zirkulierenden Östrogenspiegel erhöhtes AD-Risiko zugeschrieben (Candore et al. 2006).

3.1.4.3 Genetische Disposition

Drei mit der FAD ursächlich assoziierte Gene und ein genetischer Risikofaktor (ApoE4 Allel) wurden identifiziert (Bekris et al. 2010). In der mit einer Prävalenz zwischen 0-1% bezifferten FAD (Blennow et al. 2006) sind Mutationen im

- Amyloid precursor protein (APP)-Gen auf Chromosom 21,
- Presenilin 1-Gen auf Chromosom 14 (PSEN1) und
- Presenilin 2-Gen auf Chromosom 1 (PSEN2)

verantwortlich für die etwa in 5% der Fälle vorkommende early-onset-Variante (EOFAD) (Bird 2010). Dabei werden Mutationen im PSEN1-Gen in 20-70%, Mutationen im APP-Gen etwa in 10-15% der EOFAD beobachtet. PSEN2-Mutationen sind hingegen selten (Bird 2010). Diese Mutationen sind hoch penetrant und können Symptome hervorrufen, die sich teilweise schon vor dem 30. Lebensjahr manifestieren (Vetrivel et al. 2006). Es scheint weitere Mutationen zu geben, denn es wurden zusätzliche EOFAD-Fälle beschrieben, bei denen keine Veränderungen in den PSEN1-, PSEN2- oder APP-Genen identifizierbar waren (Bird 2010). Die familiäre late-onset Form (LOFAD) liegt etwa 95% der FAD-Fälle zu Grunde. Hierbei betreffen die Mutationen neben vielen unterschiedlichen Genen, die Varianten des ApoE. Dabei scheint insbesondere das Vorliegen von zwei e4 Allelen (e4/e4) mit der AD assoziiert zu sein (Bird 2010). Veränderungen dieser Allele können neben einer familiären Häufung auch zu einer früheren Manifestation der AD führen (Khachaturian et al. 2004). Weniger als 1% der AD sind auf eine Chromosomenmutation zurückzuführen (Bird 2010). Alle Patienten mit Downsyndrom zeigen AD-typische, neuropathologische Veränderungen ab dem 4. Lebensjahrzehnt (Geller und Potter 1999) und etwa die Hälfte von ihnen eine Abnahme kognitiver Fähigkeiten (Bird 2010). Diskutiert wird eine Trisomie-bedingte Überexpression des auf dem Chromosom 21 liegendem APP-Gens, was den erhöhten

Anfall von Aβ zur Folge hat (Moncaster et al. 2010). Mittlerweile kennt man weitere Gene, die als Risikofaktoren bei der AD-Pathogenese diskutiert werden (Ikeda und Yamada 2010).

3.1.4.4 Sonstige Risikofaktoren

Weitere, insbesondere für die sporadische AD bedeutsame Risikofaktoren beinhalten: kardiovaskuläre Risikofaktoren (Grammas 2011), Schädel-Hirn-Traumata (Ikeda und Yamada 2010), Schilddrüsenfunktionsstörungen (Tan et al. 2008), Tabakkonsum (Cataldo et al. 2010) und NSAR-Medikation (Breitner et al. 2009). Obwohl die chronische Gabe von NSAR als Risikofaktor diskutiert wird, stellt sie zugleich eine alternative Therapieoption dar (siehe 3.4.3).

3.1.4.4.1 Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Von den kardiovaskulären Risikofaktoren sind Hypertonie und Diabetes mellitus am stärksten mit der AD assoziiert (Vogel et al. 2006). Atherosklerose, Schlaganfall und Herzerkrankungen stellen neben erhöhten Homocystein- und Blutfettwerten, metabolischem Syndrom, Adipositas und Hypercholesterinämie weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren der AD dar (Grammas 2011, Humpel 2011). Neben Typ II Diabetes gelten ebenso Hyperglykämie und Insulinresistenz als Risikofaktoren der AD (Humpel 2011). Das metabolische Syndrom ist dabei besonders mit der AD der älteren Population assoziiert (Vanhanen et al 2006).

3.1.4.4.2 Alkohol- und Tabakkonsum

Nach früherer Annahme, dass Alkoholgenuss keinen Einfluss auf die Entwicklung der AD besäße (Graves et al. 1991), zeigte z. B. die Rotterdam Studie (2002) bei Patienten ab dem 55. Lebensjahr ein mit leichtem bis mäßigem Alkoholkonsum assoziiertes, reduziertes Risiko für Demenzen (Ruitenberg et al. 2002). Nach heutiger Auffassung senkt geringer bis mäßiger Alkoholkonsum (< 20 g/d) (Humpel 2011) ebenfalls das Risiko für die Entstehung der AD (Luchsinger und Mayeux 2004, Vogel et al. 2006). Für Tabakkonsum konnte hingegen keine Senkung des AD-Risikos nachgewiesen werden (Letenneur et al. 2004). García et al. (2010) schreiben Tabakkonsum keinen Einfluss auf das AD Risiko zu. Cataldo et al. (2010) stufen Rauchen jedoch als signifikanten Risikofaktor der AD ein.

3.2 Pathogenese des Morbus Alzheimer

3.2.1 Amyloid-Kaskaden- und Tau-Hypothese

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese wurde 1991 von Hardy und Allsop entwickelt und wird heute oft als zentrale Hypothese der AD-Pathogenese angesehen (Castellani und Smith 2011). Nach ihr ist A β Ausgangspunkt der Neuronendegeneration (Hardy und Allsop 1991). Dabei wirkt das in extrazellulären Plaques neben Entzündungszellen und freien Radikalen (Rosenthal und Khotianov 2003) vorliegende unlösliche A β toxisch auf Neurone und Synapsen (Kawahara 2010). Aus dem Ungleichgewicht von Bildung und Abbau (Christensen 2007) resultiert A β -Akkumulation, bei der die Ablagerung des A β -42 von besonderer Bedeutung ist (Haass 1999). Prozesse wie Inflammation und oxidative Zerstörung (Kar et al. 2004), veränderte Calciumhomeostase (Kawahara 2010), Veränderung von Kinase- und Phosphataseaktivität (Pei et al. 2008) und die Entstehung von NFT führen letztendlich zum Zelltod (Kowalska 2004). Oxidativer Stress resultiert vermutlich als eine Folge der durch A β induzierten freien Radikale (Butterfield 2002). Nach der modifizierten Amyloidhypothese kann ebenso die Akkumulation von intraneuronalem A β zur Neurodegeneration führen (Wirths et al. 2004).

Veränderte und akkumulierte Tau-Proteine scheinen als toxische Stimuli zur Neurodegeneration beizutragen (Maccioni et al. 2010). Hyperphosphorylierte Tau-Proteine gehen aus einer Aktivitäten-Imbalanz zwischen Proteinkinasen und Proteinphosphatasen hervor (Churcher 2006) und führen wegen fehlender Microtubuli-Stabilisierung (Kar 2002) zu einem ineffektiven neuronalen Transport und dem Verlust von synaptischen Funktionen (Blennow et al. 2006). Es bleibt jedoch offen, ob Tau-Phosphorylierung Ursache oder Folge der AD ist (Blennow et al. 2006).

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese steht zunehmend in Frage (Castellani und Smith 2011), bzw. wird sie als nicht vollständig korrekt erachtet (Struble et al. 2010). Man nimmt an, dass die AD-Plaques allein nicht für den massiven Zelltod verantwortlich sein dürften (Wirths und Bayer 2009). Zudem könnte A β -Ablagerung auch sekundär als Konsequenz eines metabolischen Verfalls angesehen werden (Struble et al. 2010). Mutationsbedingte, erhöhte Bildung von A β bedingt als Form der familiären AD-Variante nur einen geringen Teil aller AD-Fälle (Salkovic-Petrisic et al. 2009). Personen, die von diesen Mutationen betroffen sind, zeigen keinen Demenzausbruch vor dem 20-40 Lebensjahr (Struble et al. 2010). Bei der sporadischen AD existiert jedoch keine überzeugende Evidenz, dass A β primärer Krankheitsauslöser ist. Die Medikamentenentwick-

lungen der letzten 20 Jahre, die als primäre Ziele die Amyloid-Kaskade verfolgt haben, brachten meist enttäuschende Resultate (Medina 2011). Beispielsweise konnte für den Einsatz von A β -Antikörpern zwar eine Entfernung von akkumuliertem A β , jedoch keine Erholung degenerierter Neurone, eine Lebensverlängerung oder verminderte Progression des Demenzgrades gezeigt werden (Kuzuhara 2010). Derzeitig verfügbare Medikamente können lediglich temporär kognitive Symptome verbessern (Carter et al. 2010) und greifen als symptomatische Therapeutika in die abnormalen neurochemischen Veränderungen ein (Forette und Hauw 2010).

3.2.2 Oxidativer Stress, Inflammation und vaskuläre Dysfunktion

Inflammation und oxidativer Stress (Yao et al. 2004) scheinen bei der AD ebenfalls pathogenetisch bedeutsam zu sein. In Gehirnen von Alzheimer-Erkrankten wird durch freie Radikale die Oxidation von DNA, Proteinen und Fetten hervorgerufen (Butterfield 2002). Oxidativer Stress kann dabei A β -induziert (Sultana et al. 2009), nach einer alternativen Amyloid-Kaskaden-Hypothese aber auch die Ursache der A β -Entstehung sein (Lee et al. 2006). Da Inflammation ebenfalls ein "Hauptakteur" der Neurodegeneration ist (Morales et al. 2010), stellt diese neben einem potentiellen Angriffspunkt für Antioxidantien (Rosenthal und Khotianov 2003) auch ein Ziel entzündungshemmender Medikamente dar (Humpel 2011). Zerebrovaskuläre Dysregulation besitzt in sofern Bedeutung, dass dysfunktionelle Blutgefäße eine eingeschränkte Nährstoffzufuhr zu Neuronen, eine verminderte A β -Beseitigung (Blennow et al. 2006) sowie begrenzte Bereitstellung von Sauerstoff bedingen (Humpel 2011). Dass zerebrale Minderperfusion aufgrund eines im Gehirn verursachten Hypometabolismus eine Kognitionsverminderung bewirken kann, wurde bereits vermutet (Lee et al. 2011). Zudem ist bei der AD die regionale Verminderung des Glucosemetabolismus im Neocortex (hinteres Cingulum, temporoparietaler und frontaler Assoziationscortex) typisch (Herholz 2003).

3.2.3 Integrative Modelle der Alzheimer-Pathogenese

Weitere Einflüsse wie z. B. das Versagen des axonalen Transports (Stokin und Goldstein 2006), glutamaterge Neurotoxizität (Takada-Takatori et al. 2009), Dysfunktion von Zellorganellen (z. B. Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum) (Takuma et al. 2005), Metallionen (Budimir 2011), Veränderungen des Nerve growth factors (NGF), Azidose (Humpel 2011) oder Zell-Zyklus-Störungen (Webber et al. 2005) werden bei

der Pathogenese der AD diskutiert. Die Gründe der Erkrankung sind jedoch letztendlich nicht geklärt (Humpel 2011). Nach Rosenthal und Khotianov (2003) und Humpel (2011) treten mehrere Charakteristika wie Amyloidbildung, Entstehung von NFT, Entzündungsreaktion, oxidativer Stress sowie Neurodegeneration und Zelltod in Wechselbeziehung. Basierend auf einem integrativen Modell mit unterschiedlichen Zerstörungssignalen (A β , freie Radikale, Eisenüberladung, Homozystein, Cholesterin und LDL) führt Aktivierung von Mikroglia, welche proinflammatorische Zytokine ausschütten, zu neuronaler Degeneration und Modifizierung des Tau-Proteins (Maccioni et al. 2010). Morales et al. (2010) favorisieren ebenfalls die über Mikrogliazellen vermittelte Inflammation, resultierend in Tau-Hyperphosphorylierung und Selbstaggregation zu neurotoxischen Oligomeren.

3.3 Die cholinerge Hypothese

Da der Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) eine besondere Bedeutung bei kognitiven Prozessen hat, erfolgt eine eigenständige Darstellung der cholinergen Hypothese.

3.3.1 Das cholinerge System

Das cholinerge System wird mit kognitiven Fähigkeiten in Verbindung gebracht (Graef et al. 2011) und ist somit bei Aufmerksamkeitsprozessen, beim Arbeiten, bei Funktionen des räumlichen und des expliziten Gedächtnisses, bei der Informationsspeicherung, der Weiterleitung von Sinneswahrnehmungen an motorische Hirnregionen und dem Erlernen von Fähigkeiten beteiligt (Pepeu und Giovanni 2010). Bei Versuchen im Water- oder Radial Maze zeigen Nagetiere beim Einsatz von Anticholinergika wie Atropin oder Scopolamin eine verminderte Gedächtnisleistung (Terry und Buccafusco 2003). Neuroanatomisch sind entorhinaler- und perirhinaler Cortex sowie Hippocampus wichtige Lokalisationen bei der Verschlüsselung von neuem episodischem Gedächtnis (Hasselmo 2006). Der Ursprung der u. a. den Hippocampus und das Großhirn innervierenden cholinergen Neurone liegt in den Kernen des basalen Vorderhirns (Messer Jr. 2004). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass Läsionen, die den cholinergen Input vom basalen Vorderhirn zum Neocortex oder Hippocampus unterbrechen, eine Verminderung der Leistung bei vergleichbaren Gedächtnisaufgaben, wie bei Durchführung einer cholinergen Blockade, bedingen (Terry und Buccafusco 2003). Von den zum cho-

linergen System gehörenden Acetylcholinrezeptoren (AChR) sind zwei Haupttypen bekannt (Graef et al. 2011):

- Muscarinerge Acetylcholinrezeptoren (mAChR)
- Nicotinerge Acetylcholinrezeptoren (nAChR)

Die mAChR werden außer im zentralen- und peripheren Nervensystem auch auf nicht-neuronalen Zellen exprimiert. Man kennt 5 Subtypen (M1-M5) (Ishii und Kurachi 2006), wovon im ZNS die M1-, M2- und M4- Subtypen vorherrschend sind (Volpicelli und Levey 2004). Im Gegensatz zu nAChR sind mAChR den metabotropen Rezeptoren zuzuordnen (Eglen 2006). Die Signaltransduktion erfolgt unter Beteiligung von G-Proteinen und second messenger (Rho und Storey 2001). Die Lokalisation der nAChR erstreckt sich neben dem zentralen und peripheren Nervensystem ebenfalls auf nicht-neuronale Zellen (Gahring und Rogers 2006). Sie sind ionotrope Rezeptoren und fungieren als ligandengesteuerte Ionenkanäle (Astles et al. 2002).

3.3.2 Acetylcholin und Gedächtnis

ACh ist ein Neurotransmitter des zentralen Nervensystems (Nirogi et al. 2010) und vermittelt seine Wirkung über m- und nAChR (Wessler und Kirkpatrick 2008). Daneben sind Glutamat, γ -Aminobuttersäure (GABA), Dopamin, Serotonin, Noradrenalin (Jones 1986) und Glycin (Keck und White 2009) weitere Neurotransmitter im ZNS. Außer bei der Entwicklung des zerebralen Cortex, der Kontrolle des zerebralen Blutflusses und der Schlaf-Wach-Rhythmen (Schliebs und Arendt 2006), ist ACh bei der Modulierung kognitiver Fähigkeiten involviert und besitzt maßgebliche Bedeutung in Bezug auf Aufmerksamkeitsreaktionen (Francis et al. 1999). Zudem verknüpft ACh das cholinerge System mit dem dopaminergen Belohnungssystem (Lester et al. 2010). Im Rahmen der Gedächtnisverschlüsselung erhöht es den afferenten Input zum Cortex, reguliert Theta-Rhythmus-Oszillationen im Hippocampus, verstärkt die Feuerrate von corticalen Neuronen zur Beibehaltung neuer Information und unterstützt die Langzeitpotenzierung (engl.: Long term potentiation = LTP) in vielen Hirnregionen (Hasselmo 2006). Unter LTP versteht man die andauernde Verstärkung der Effizienz synaptischer Übertragung. Sie wird u. a. als zelluläres Substrat für Lernvorgänge diskutiert (Heckmann und Dudel 2007). Somit ist die synaptische Plastizität vom cholinergen Input abhängig (Sugisaki et al. 2011).

Eine weitere wichtige Funktion des ACh bei kognitiven Prozessen besteht in der Integration von cholinergem- und sensorischem Input. Wie bereits erwähnt, bestimmt die Aktivität von cortikalem cholinergem Input die Effizienz des Lernens und des Gedächtniserwerbs (Sarter et al. 2003), wobei hohe ACh-Konzentrationen vorwiegend bei Aufmerksamkeitsreaktionen und der Gedächtnisverschlüsselung, niedrige ACh-Konzentrationen hingegen bei der Konsolidierung erforderlich sind (Hasselmo und McGaughy 2004).

3.3.3 Cholinerges Defizit

Die cholinerge Hypothese basiert auf einem cholinergen Defizit, welches sowohl durch verminderte ACh-Synthese als auch durch verminderte ACh-Freisetzung entsteht. Deshalb wurde nach Medikamenten geforscht, die das cholinerge Defizit ausgleichen sollten (Francis et al. 1999). Hinweise auf die Bedeutung von ACh für die AD lieferten Beobachtungen nach Gabe anticholinerg wirksamer Pharmaka wie Scopolamin oder Atropin (Buccafusco 2004). Im Verlauf der AD beobachtet man einen Verlust cholinergischer Neurone und ihrer cortikalen Projektionen vom Nucleus basalis und angrenzenden Regionen ins Vorderhirn (Lane et al. 2006). Dieser korreliert sowohl mit verminderten kognitiven Funktionen, als auch mit dem Akkumulationsgrad der NFT (Leonard 2004). Der Verlust synaptischer Vesikel innerhalb der Axonterminale (Lane et al. 2006) und verminderte Synapsendichte (Coleman und Yao 2003) verstärken dabei das cholinerge Defizit. Außerdem beobachtet man neben einer verminderten ACh-Konzentration (Lane et al. 2006) und dem Aktivitätsverlust des an der ACh-Synthese beteiligten Enzyms Cholinacetyltransferase (ChAT) (Lane et al. 2006), eine Reduktion präsynaptischer mAChR und nAChR sowie eine Unterbrechung der Kopplung postsynaptischer Rezeptoren mit ihrem second messenger (Francis et al. 1999).

3.3.4 Cholinerge Hypothese, β -Amyloid und neurofibrilläre Tangles in Wechselbeziehung

Bis heute gelang es nicht, einen einzelnen pathogenetischen Weg bei der komplexen multifaktoriellen Alzheimer-Erkrankung festzulegen (Chopra et al. 2011). Neben amyloidabhängigen werden amyloidunabhängige Mechanismen (Pimplikar et al. 2010) und die zusätzliche Interaktion verschiedener Risikofaktoren diskutiert (siehe 3.1.4). Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese und die cholinerge Hypothese sind weitgehend akzeptiert (Pákási und Kálmán 2008). A β kann über Interaktion mit nAChR toxische Wir-

kung vermitteln (Kar et al. 2004). Daneben inhibiert es die Induzierung hippocampaler LTP und unterbricht die synaptische Plastizität (Blennow et al. 2006). Die Bildung von Amyloid-Plaques löst durch Aktivierung von Astrozyten und Gliazellen und damit verbundener Ausschüttung von Zytokinen eine Entzündungskaskade aus (Rosenthal und Khotianov 2003). Die Komplement-Bindung verursacht neben einem Calciueinstrom in Neuronen, Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen und neuronaler Dysfunktion einen Synapsenuntergang, verminderte Neurotransmitterausschüttung (speziell ACh) und Zelltod (Rosenthal und Khotianov 2003).

Man weiß zudem, dass ein Anstieg cholinergischer Mechanismen die Prozessierung des APP zu Amyloid vermindert, wohingegen eine pathologische Reduktion cholinergischer Neurotransmission eine Amyloidbildung bedingt (Lane et al. 2006). Die Downregulation von cholinergen und glutamatergen Rezeptoren scheint verminderte Gedächtnisleistungen und vermehrte A β -Produktion in der Frühphase der AD hervorzurufen (Schaeffer und Gattaz 2008). Die Aktivierung cholinergischer Rezeptoren moduliert neben der APP-Produktion ebenfalls die Tau-Phosphorylierung (Kar 2002). Hyperglykämie scheint mit vermehrter Bildung von Reactive oxygen species (ROS) und Advanced glycation endproducts (AGE) assoziiert zu sein und vermag Gedächtnis und Kognition zu beeinflussen (Humpel 2011). Insulin reguliert den Metabolismus von Tau-Proteinen und Amyloid und kann ebenfalls synaptische Plastizität sowie Gedächtnis und Lernvorgänge modulieren (Biessels und Kappelle 2005). AD-Patienten besitzen eine verringerte Insulin-Clearance, welche mit einem A β -Anstieg im Plasma korreliert (Kulstad et al. 2006). Gestörte Insulinsignale bewirken u. a. über Störungen des zellulären Glucose- und ACh-Haushaltes die Akkumulation von A β und die Tau-Hyperphosphorylierung (Humpel 2011). Lösliches A β ist auch ohne Krankheitswert im Gehirn vorhanden und besitzt, neben der fraglichen Auslösung von Demenz, in geringer Konzentration mögliche weitere Funktionen (Struble et al. 2010), wie beispielsweise die Modifizierung synaptischer Plastizität (Puzzo et al. 2008). Zudem werden bei 20-30% der kognitiv nicht eingeschränkten Personen post-mortem Amyloidplaques nachgewiesen (Struble et al. 2010). In physiologischer Konzentration reguliert A β die Synthese und Ausschüttung von ACh im Sinne einer Neuromodulation, ohne dass von einer Neurotoxizität gesprochen werden kann (Kar et al. 2004). Zudem erfolgt Amyloid-Synthese auch in normalen Zellkulturen (Haass et al. 1992). Ein Schlüssel zur Vereinigung von cholinergischer Hypothese mit Mechanismen der A β -Ablagerung, Tau-Phosphorylierung und den ApoE4-Anomalien könnte der nicotinerge Alpha7-Rezeptor (α 7nAChR) sein (Bencherif und Lipiello

2010). Dieser ist in für die Kognition wichtigen Bereichen des Gehirns zu finden und dürfte ein reizvolles therapeutisches Ziel bei der Behandlung der AD darstellen (Wallace und Porter 2011). Er ist in die Modulation des Zellüberlebens involviert (Bencherif und Lipiello 2010), und seine Aktivierung mit Agonisten unterstützt LTP (Wallace und Porter 2011). Daraus resultierend führen Faktoren wie primärer ACh-Mangel, verminderte kognitive Aktivität sowie Bindung von Amyloid und ApoE4 an den $\alpha 7$ nAChR zur Verringerung der neuronalen Überlebensfähigkeit (Bencherif und Lipiello 2010).

3.4 Therapie des Morbus Alzheimer

3.4.1 Medikamentöse Therapie mit nachgewiesener Wirksamkeit

Gegenwärtig gibt es keine effektive medikamentöse Therapie, die den Ausbruch oder die Progression der AD aufhält (Holtzman et al. 2011), denn bislang konnte die Neurodegeneration mit keinem Medikament rückgängig gemacht oder verzögert werden (Chopra et al. 2011). Die aktuell verfügbaren Pharmaka mit nachgewiesener Wirksamkeit zur Behandlung der Kernsymptomatik der AD sind Acetylcholinesteraseinhibitoren (AChEI) und der nicht-kompetitive NMDA-Antagonist Memantin (S3-Leitlinie 2009). Ergänzend werden noch weitere Pharmaka, wie z. B. Antidepressiva, bei gleichzeitig vorliegender Depression eingesetzt (Bird 2010).

3.4.2 Cholinomimetika - Bedeutung der Acetylcholinesteraseinhibitoren

Von den meisten Ärzten und Patienten werden für die Behandlung milder bis mäßiger AD-Formen heutzutage Medikamente bevorzugt, die die beschriebenen cholinergen Defizite ausgleichen sollen (Birks 2006). Diese, als Cholinomimetika bezeichneten Pharmaka, bilden 2 Hauptgruppen:

- Direkte Parasympatikomimetika (Muscarinerge Agonisten)
- Indirekte Parasympatikomimetika (Cholinesteraseinhibitoren)

Direkte Parasympatikomimetika besitzen nur eine vergleichsweise kurze Wirkdauer (Messer Jr. 2004), und ihre Selektivität bezüglich der Rezeptor-Subtypen ist sehr gering (Jakubík et al. 2008). Deshalb besteht erhebliches Interesse an der Erforschung von beispielsweise M1-selektiven Agonisten (Fisher 2008). Die Idee der ACh-Erhöhung zur

Beseitigung kognitiver Defizite hat zur Entwicklung von Hemmstoffen der Acetylcholinesterase (AChEI) geführt (Martorana et al. 2010). Sie stellen die am besten untersuchten Antidementiva dar (Kriegelstein 2002). Ihre Wirkung beruht auf der Inhibierung der u. a. im Gehirn vorhandenen Acetylcholinesterase (AChE). Man erwartet von AChEI nicht die Beseitigung der AD-Ursache, jedoch sollen sie temporär die Symptome lindern (Blennow et al. 2006). Die Butyrylcholinesterase (BuChE) kommt hauptsächlich in der Peripherie (Francis et al. 1999) sowie in den zum frontalen Cortex projizierenden Neuronen vor (Lane et al. 2006). Dieses Enzym zeigt im Verlauf der AD einen Aktivitätsanstieg, während für die AChE ein Aktivitätsabfall zu verzeichnen ist (Lane et al. 2006). In der Vergangenheit wurde bereits durch selektive BuChE-Inhibierung bei älteren Ratten ein Anstieg extrazellulärer ACh-Level mit Verbesserung von Lernprozessen in Labyrinthversuchen gezeigt (Lane et al. 2006). Beide Cholinesterasen (ChE) könnten durch ihre regulatorische Funktion zusätzliche ACh-vermittelte Aufgaben, wie die Modulation weiterer Proteine oder des regionalen Blutflusses, der Tau-Phosphorylierung und der Ablagerung von Amyloid, besitzen (Lane et al. 2006). Während der NMDA-Antagonist Memantin ein Therapeutikum der moderaten bis schweren AD ist (Galimberti und Scarpini 2011), sind für die leichte bis mittelschwere AD in Deutschland die AChE-Inhibitoren Donepezil, Galantamin und Rivastigmin zugelassen. Bei Vorliegen einer schweren Demenz ist für Donepezil und Galantamin bei fehlender Zulassung ggf. eine Off-label Therapie vertretbar (S3-Leitlinie 2009). Tacrin, der erste verfügbare AChEI, wurde wegen seiner Hepatotoxizität in vielen Ländern wieder vom Markt genommen. Alle drei in Deutschland zugelassenen AChEI erzielen eine Verbesserung in den Bereichen Kognition, Aktivitäten des täglichen Lebens und Verhaltenssymptome (Salawu et al. 2011). Der Einsatz von AChEI wird im Krankheitsverlauf so früh wie möglich empfohlen (Seltzer 2006). Ihre Wirkung ist bei allgemein guter Verträglichkeit dosisabhängig. Am häufigsten, jedoch oft durch das nur schrittweise Aufdosieren oder die Einnahme während des Essens vermeidbar, sind gastrointestinale Nebenwirkungen, wie Übelkeit und Erbrechen (Alva und Cummings 2008). Eine Verbesserung der Verträglichkeit kann z. B. durch die transdermale Applikation (Rivastigmin) erzielt werden (Dhillon 2011).

3.4.3 Alternative Therapieoptionen bei Morbus Alzheimer

Nach Humpel (2011) reduzieren Statine die Prävalenz der AD, wohingegen andere Autoren (Blennow et al. 2006) dies nicht bestätigen. Die Evidenz bezüglich der Assoziation von Cholesterin mit der AD ist unklar, denn die in einigen Studien durch Einsatz von Statinen gezeigte Senkung des Demenzrisikos wird von manchen Untersuchern als Artefakt betrachtet (Gandy 2005). Der Einsatz von A β -Vakzinen ergab bisher keinen Hinweis für Lebensverlängerung oder Verzögerung der Schwere der Demenz beim Menschen (Kuzuhara 2010). Die Senkung der AD-Inzidenz durch postmenopausale hormonelle Ersatztherapie wurde diskutiert (Markou et al. 2005), konnte aber z. B. im Rahmen der Women's Health Initiative Memory Study nicht nachgewiesen werden (Jung et al. 2008). Dem Einsatz von Antioxidanzien wird eine mögliche AD-Risikosenkung nachgesagt (Blennow et al. 2006). Beim Menschen konnte eine Verzögerung der AD-Progression für Vitamin E nachgewiesen werden. Für Selegilin, Vitamin C und Ginkgo biloba war dies allenfalls minimal zutreffend (Rosenthal und Khotianov 2003). Beispiele aus der Vielzahl noch in Erforschung befindlicher Therapeutika sind

- NSAR (Bird 2010) (ebenfalls Risikofaktor, siehe 3.4.1.1),
- Nerve growth factor (Neugroschl und Sano 2010),
- β - und γ -Sekretaseinhibitoren (Blennow et al. 2006),
- Amyloid-Aggregations-Blocker (Blennow et al. 2006),
- Chelatkomplexbildner (Budimir 2011),
- aktive und passive Vakzine gegen Amyloid (Blennow et al. 2006),
- Insulindegrading-Enzym (Qiu und Folstein 2006),
- Neprilysin (Wang et al. 2010a) und
- Tau-Kinase-Inhibitoren (Neugroschl und Sano 2010).

Viele dieser Therapeutika befinden sich in den Spätphasen klinischer Studien (Gravitz 2011).

Es gibt Vermutungen, dass der AD-Symptomatik ein kombiniertes cholinerges und glutamaterges Defizit zugrunde liegt, so dass Therapiestrategien die Beeinträchtigungen beider Neurotransmittersysteme umfassen sollten (Schaeffer und Gattaz 2008). Zudem bietet die Wiederherstellung des Zusammenspiels zwischen ACh und weiteren, ebenfalls bei Gedächtnis- und Aufmerksamkeitsprozessen beteiligten Neurotransmittern, wie

Dopamin, Noradrenalin und Serotonin, zusätzliche therapeutische Ansätze (Martorana et al. 2010).

3.5 Working memory, Radial Maze und Scopolaminmodell

Der Begriff Arbeitsgedächtnis (engl.: working memory) wurde erstmals 1970 im Zusammenhang mit der Kognition im Tierversuch von David Olton und Werner Honig verwendet (Dudchenko 2004). Das Arbeitsgedächtnis ist Teil des Kurzzeitgedächtnisses. Es zeichnet sich dadurch aus, dass Informationen nach Pausierung bestimmter Reize wieder gelöscht werden. Das Bezugsgedächtnis hingegen bleibt über Tage und Monate bestehen und bildet sich durch wiederholtes Training aus. Eine absolute Trennung dieser beiden Gedächtnisformen besteht jedoch nur theoretisch, praktisch treten Überlappungen auf (Dudchenko 2004). Zur Messung von Lern- und Gedächtnisprozessen, die sich auf die räumlich-visuelle Wahrnehmung der Umwelt stützen, können beispielsweise offene Labyrinth verwendet werden. Diese unterscheiden sich in vielen Kriterien, beispielsweise in ihrem Aufbau (Hodges 1996). Das Radial Maze ist seit seiner Entwicklung durch Olton und Samuelson (1976) sehr populär geworden und wird zur Untersuchung des räumlichen Gedächtnisses von Nagetieren verwendet. Dubreuil et al. (2003) gehen davon aus, dass die Tiere in den Versuchen jedoch auch andere Strategien zur Bewältigung der Labyrinthaufgaben, die unabhängig vom räumlichen Gedächtnis funktionieren, verwenden. Mit Hilfe des Radial Maze lassen sich Defizite des Bezugs- und des Arbeitsgedächtnisses messen. Im Gegensatz zum Water Maze ist es außerdem gut für wiederholte Messungen geeignet (Hodges 1996). In Bezug auf das Radial Maze bedeutet „Arbeitsgedächtnis“ nach Olton und Samuelson, dass die Nagetiere in ein und demselben Versuchslauf in der Lage sind, sich zu erinnern, welchen Arm sie besucht haben. Für den nächsten Versuch, beispielsweise am folgenden Tag, ist dieses Gedächtnis jedoch nicht mehr relevant. Praktisch lässt sich eine reduzierte Gedächtnisleistung sowohl bei Menschen als auch bei Tieren (Messer Jr. 2004) mit Hilfe der zentralen Wirkung von ACh-Antagonisten simulieren. Ein Beispiel ist die Auslösung von Amnesien bei Nagetieren. Aufgrund seiner hohen ZNS-Gängigkeit eignet sich dafür insbesondere das Anticholinergikum Scopolamin (Buccafusco 2004). Es wird als Referenzsubstanz für die Induktion kognitiver Defizite bei gesunden Menschen und Tieren verwendet (Klinkenberg und Blokland 2010). Seine Auswirkung auf die Lern- und Gedächtnisleistung, die bei Scopolamindosierungen ab 0,03 mg/kg KM beobachtet

wird, kann durch primäre Effekte auf die Aufmerksamkeit und Reizdiskriminierung, durch unspezifische Effekte auf das Verhalten (z. B. Bewegungsaktivität, Angst) und durch periphere Nebeneffekte (Pupillendilatation, veränderter Speichelfluss) erklärt werden (Klinkenberg und Blokland 2010).

4. Zielstellung der Arbeit

Auf der Suche nach neuen Alzheimer-Medikamenten, die sowohl die Kognition verbessern, als auch geringere Nebenwirkungen besitzen sollten, wurden von Herrn Dr. Lei Fang (Institut für Pharmazie der FSU Jena) fünf neue Tacrinderivate (FL15, FL16, FL38, FL98 FL99) und ein Alkylnitrat (NO-Donator) synthetisiert.

Tacrin ist ein reversibler Hemmstoff der ACh- und der BuChE (Proctor und Harvey 2000). Die Hemmung beider ChE erfolgt dabei durch kompetitive sowie nicht-kompetitive Mechanismen und allosterische Modulation der katalytischen Aktivität (Francis et al. 1999). Aktuelle Studien zeigen, dass Tacrin bei der Behandlung der AD weitere Angriffspunkte besitzen könnte (Tumiatti et al. 2010). Als ein Beispiel dafür ist seine neuroprotektive Wirkung, die durch Modifizierung der Signalübertragung am nicotinergen Rezeptor vermittelt wird (Takada-Takatori et al. 2009), zu nennen. Die wichtigste Nebenwirkung des Tacrins ist seine Hepatotoxizität, weswegen es in vielen Ländern vom Markt genommen wurde. Zu untersuchen war, ob die neu synthetisierten Substanzen die durch Scopolamin bedingte Störung des Arbeitsgedächtnisses der Ratte im 8-Arm-Radial Maze im Vergleich zu Tacrin genauso oder möglicherweise noch besser antagonisieren können. Zudem wurde die Hepatotoxizität der Substanzen FL16 und FL38 untersucht und mit der des Tacrins verglichen.

Man weiß, dass NO (Endothelium-derived relaxing factor = EDRF) eine wichtige Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen (Thatcher et al. 2005) spielt und zudem hepatoprotektiv wirken kann (Pae et al 2000). Daneben ist es an der Regulation des zerebralen Blutflusses, der Zellentwicklung und dem Schutz der Nervenzellen vor Faktoren, die mit der AD assoziiert sind, beteiligt (Toda et al. 2009b). Neue NO-Tacrinverbindungen könnten bei Vorliegen einer cholinergen Dysfunktion durch die NO-Wirkung, die Hemmung der ChE und die fehlende Hepatotoxizität Grundlage neuer Pharmaka in der AD-Therapie sein.

Alle von Herrn Dr. L. Fang synthetisierten Tacrinderivate bestehen aus einem Tacrin-Heterozyklus, an den in Position 9 über eine Alkylendiamin-Seitenkette unterschiedlicher Länge ein Ligand verknüpft ist. Bei drei der Substanzen (FL16, FL38 und FL98) wurde jeweils ein Nitratrest, der als NO-Donator fungiert, über die Alkylendiamin-Seitenkette mit dem Tacrin-Heterozyklus gekoppelt. Die Alkylendiamin-Seitenkette besitzt neben der Verbindung zum NO-Donator eine weitere Funktion. Diese besteht in

der Inhibierung der peripheral anionic site (PAS) der ChE (Fang et al. 2008). Unter der Fragestellung, ob die Nitratgruppe eine Verbesserung der *in vivo*-Aktivität zeigt, wurden die Substanzen FL38, FL99 und der NO-Donator allein und in Kombination verabreicht. Nach vorheriger Ermittlung der ChE-Hemmung (halbmaximale Hemmkonzentration = IC_{50}) *in vitro*, wurden die neuen Substanzen an erwachsenen Ratten im Labyrinth untersucht. Zur Erzeugung einer Kognitionseinschränkung wurde den Ratten Scopolamin verabreicht. Tacrin diente als Positivkontrolle zur Antagonisierung des Scopolamineffekts. Zur Untersuchung der Hepatotoxizität der Substanzen FL16 und FL38 wurden nach einmaliger Verabreichung von Tacrin, FL16 und FL38 in equimolarer Dosierung u. a. Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Laktatdehydrogenase (LDH) und Albumin sowie die Gesamtproteinkonzentration im Lebergewebe bestimmt.

5. Material und Methoden

5.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um weibliche Wistar-Ratten (Han:Wist) des institutseigenen Auszuchtstammes. 30 Tage nach der Geburt wurden die Ratten vom Muttertier abgesetzt und jeweils 4 Tiere in einem Kunststoffschalenkäfig mit Metallgitterabdeckung (70cm x 35cm x 20cm; L x B x H) gehalten. Die Einstreu (Altromin Animal Bedding Grannular; Lage; BRD) wurde zweimal pro Woche gewechselt, und die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (Altromin 1316; Lage; BRD). Die Raumtemperatur wurde durch Klimatisierung konstant bei 23°C gehalten, die Luftfeuchte betrug $50 \pm 10\%$. In den Zucht- und Tierhaltungsräumen herrschte ein künstlicher Hell-Dunkel Rhythmus von 12h/12h. Die Ratten wurden zum Zähmen, Training und zum Versuch ins Labor verbracht. Zu Versuchsbeginn waren die Tiere 50 ± 5 Tage alt und hatten ein Körpergewicht von ca. 130g.

5.2 Chemikalien

5.2.1 Scopolamin

Scopolamin (siehe Abb. 1) ist ein Alkaloid und wirkt atropinartig als nicht-selektiver kompetitiver Antagonist am mAChR im zentralen und peripheren Nervensystem. Beim Menschen besitzt es zentral sedative, antiemetische und amnestische Effekte (Renner et al. 2005). Scopolamin wurde von der Firma SIGMA (München; BRD) bezogen. Es wurde in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst, so dass den Versuchstieren die Dosis von 0,05 mg/100 g KM in 1 ml/100 g KM i. p. verabreicht werden konnte. Durch die Wahl dieser Scopolamindosierung wurde sichergestellt, dass die gewünschten Effekte auf die Lern- und Gedächtnisleistung der Tiere hervorgerufen werden (siehe 3.5).

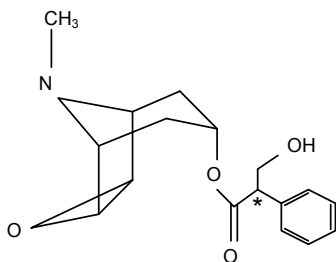


Abb. 1: Scopolamin

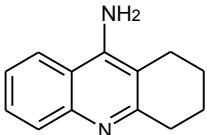
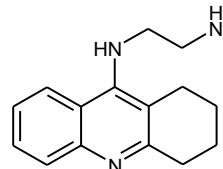
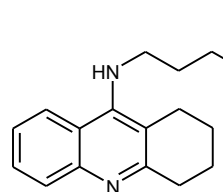
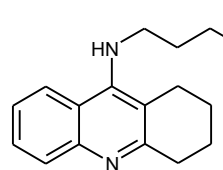
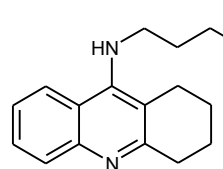

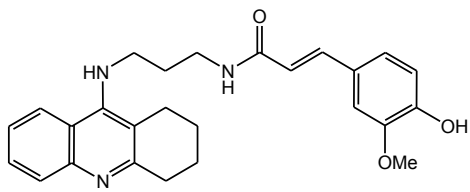
5.2.2 Tacrin

Tacrin (siehe Tab. 1) wurde als Positivkontrolle eingesetzt, mit der die Wirkung der neu entwickelten Substanzen verglichen wurde. Den Ratten wurde Tacrin in der Dosierung 2 $\mu\text{mol}/100\text{ g KM}$, allein oder 10 min. nach Scopolamin, i. p. injiziert. Tacrin wurde in Form von Tacrinhydrochlorid (Novartis; Nürnberg; BRD) verwendet.

5.2.3 Versuchssubstanzen

Es wurden sechs Substanzen untersucht (siehe Tab. 1), die von Herrn Dr. L. Fang, Institut für Pharmazie der FSU Jena, synthetisiert worden waren. Es handelt sich um neue Tacrinderivate und einen NO-Donator. Während die Substanzen FL15 und FL16 eine Amidbindung enthalten, stellen die Substanzen FL38, FL98 und FL99 Amine dar.

Tab. 1: Substanzen mit Strukturformel, Molekulargewicht (MG), halbmaximaler Hemmkonzentration (IC₅₀), Selektivität und Lipophilie (log P); n = Anzahl der Versuchstiere (Für die Bestimmung der log P-Werte danke ich Herrn Dr. Lei Fang)

Substanz Strukturformel (Anzahl der untersuchten Tiere)	MG [g/mol]	IC ₅₀ _{AChE} IC ₅₀ _{BChE} [nM]	IC ₅₀ _{AChE} / IC ₅₀ _{BChE}	log P
Tacrinhydrochlorid (n = 12) 	253	45,1 5,1	8,8	2,63
FL98 (n = 14) 	283	9,1 7,3	1,4	2,80
FL16 (n = 12) 	359	28,2 13,5	2,09	2,12
FL38 (n = 12) 	372	5,6 9,9	0,57	3,44
FL99 (n = 15) 	311	23,4 7,2	3,2	4,02
NO-Donator (n = 12) 	105	nicht ermittelt	nicht ermittelt	1,29
FL15 (n = 14) 	431	33 27	1,22	3,91

5.3 Messeinrichtung

Die räumliche Orientierung, als Maß der kognitiven Leistung, kann im 8-armigen Radial Maze untersucht werden, das von der Firma Technical & Scientific Equipment (TSE) GmbH (Bad Homburg; BRD) bezogen wurde (siehe Abb. 2). Das aus dunkelgrauem Kunststoff gefertigte Labyrinth besteht aus einer octagonalen zentralen Plattform mit einem Durchmesser von 50 cm. Von der als Startpunkt für die Ratten dienenden Plattform gingen sternförmig 8 Labyrintharme aus. Jeder dieser Arme hatte eine Länge von 43 cm, eine Breite von 14 cm und 30 cm hohe Wände. Am Ende eines jeden Armes befand sich eine kleine Futterschale (5cm x 2.5cm x 3cm), die vor jedem Lauf mit je einem Pellet Belohnungsfutter (Dustless Precision Rodent Pellets, Bilaney Consultants Ltd, Sevenoak, Kent, UK) bestückt wurde.

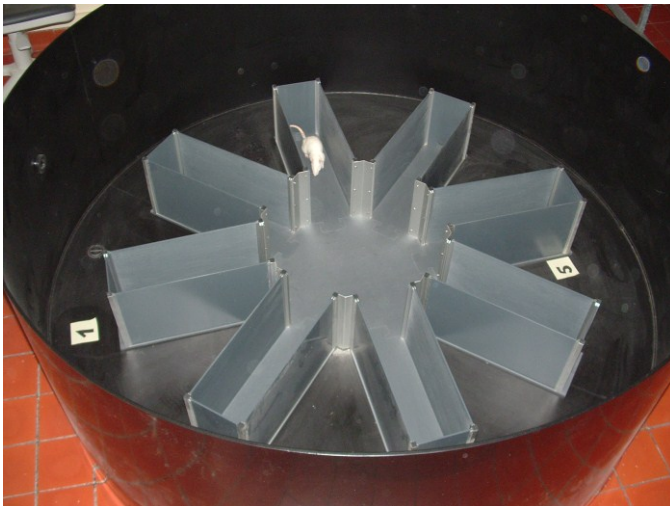


Abb. 2: 8-Arm-Radial Maze

Die Bewegungen der Ratte wurden mit einer Schwarz/Weiß-Kamera der Firma Videor Technical E. Hartig GmbH (Rödermark, BRD), die sich in ca. 2,5 m Höhe zentral über dem Labyrinth befand, dokumentiert und an das Computerprogramm TSE VideoMot 2 übermittelt. Dieses erlaubt kameraüberwachte, computergestützte Beobachtungen sowie Analysen der Aktivitäten und Bewegungen der Ratte. Da die Objekterkennung dieses Systems auf Kontrastmessung basiert, wurde der Raum, in dem der Versuch durchgeführt wurde, während der Aufnahme abgedunkelt. Somit wurden nur die Bewegungen des Versuchstiers mit weißem Fell auf dunklem Untergrund registriert. Das auf den Computer übertragene Bild wurde von einem vorher aufgenommenen Hintergrundbild subtrahiert, und das resultierende Differenzbild aufgezeichnet. Von jedem Versuch

konnten Protokolle gespeichert werden, die neben den individuellen Versuchsangaben (Dosis, Zeit, Besuche in den Futterregionen und Geschwindigkeit), die zurückgelegten Strecken als Aufzeichnungen beinhalteten. Die Anwesenheit des Tieres in jeder Region wurde protokolliert. Mit Hilfe eines DVD-Recorders bestand die Möglichkeit, die einzelnen Versuche aufzuzeichnen und auf DVD zu speichern. Im Menü der Software konnte man verschiedene Untermenüs auswählen. Zunächst wurde das Hintergrundbild aufgezeichnet, dann wurde die Versuchsregion definiert, auf die sich das System bei der Identifizierung der Objekte beschränkte. Innerhalb der Versuchsregion befand sich eine Informationsregion und eine Steuerregion, welche zusätzliche Steuerfunktionen (Start, Pause und Stop) besaß.

5.4 Methode

Zähmen und Training der Ratten sowie die Versuchsdurchführung basierten auf einem zeitlichen Ablauf, der sich bereits in vorangegangenen Arbeiten bewährt hat und den standard operating procedures (SOP) des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie des Klinikums der FSU Jena zu entnehmen ist. Das Zähmen der Ratten dauerte 7 Tage. In dieser Zeit wurde jede Ratte etwa 5 min. pro Tag vom Betreuer in die Hand genommen. Dabei sollte ihnen die Scheu vor dem Menschen genommen werden. Anschließend folgte eine 2-tägige Adaptation an das Labyrinth, um die Tiere auf die Trainingsläufe vorzubereiten. In dieser Phase wurden die Tiere in Gruppen von 2-3 Ratten für circa 5 Minuten in das Labyrinth gesetzt. Dabei wurde zunächst nur auf der zentralen Plattform, später dann auch in verschiedenen Bereichen des Labyrinths Belohnungsfutter positioniert, so dass für die Tiere ein Anreiz bestand, sich im gesamten Labyrinth zu orientieren und sich optimal an die neue Umgebung und das Belohnungsfutter zu gewöhnen. In den darauf folgenden Tagen befanden sich die Ratten einzeln im Radial Maze, in dessen Armen jeweils 1 Belohnungsfutter-Pellet platziert worden war. Hintergrund war hierbei, die nun mit dem Belohnungsfutter vertrauten Tiere zu motivieren, dieses möglichst schnell zu finden. Nach insgesamt 2 Wochen waren die Ratten im Allgemeinen an die Betreuer, die Umgebung und das Labyrinth adaptiert, so dass mit den Versuchen begonnen werden konnte.

5.4.1 Training

Zu Beginn des Trainings wurde eine Futterreduktion vorgenommen. Das Hungergefühl sollte die Ratten zur Futtersuche motivieren, so dass sie einen Versuchslauf im Radial Maze fehlerfrei und in kürzester Zeit absolvieren. Dazu wurde die tägliche Futtermenge auf 7-10 g pro Tier beschränkt. Ziel war dabei, eine Gewichtsreduktion von ca. 10% zu erreichen. Im Anschluss daran wurde das Gewicht durch entsprechende Futtermengen-anpassung während des Versuchs konstant gehalten.

Im Maze befand sich in jedem der 8 Arme ein Pellet, so dass ein Versuchstier maximal 8 Pellets fressen konnte. Die Ratten absolvierten das Training am Vormittag. Als Fehler wurde das wiederholte Besuchen eines Labyrintharms definiert. Ein geeignetes Tier benötigte weniger als 60 Sekunden zur Absolvierung des Labyrinthes, fraß alle Pellets, beging die Arme nacheinander und machte dabei 0-1 Fehler. Die zurückgelegte Strecke betrug etwa 600 cm. Zwischen den Läufen wurden Kot- und Urinrückstände der Tiere aus dem Labyrinth mit Hilfe einer 2,5%igen Sterilium®-Lösung entfernt. Dadurch wurde eine Ablenkung der nachfolgenden Tiere durch den Geruch des Vorgängers verhindert. Von allen Tieren wurde in jedem Lauf folgendes protokolliert:

- Gesamtfehleranzahl
- Gesamtlaufzeit bis alle 8 Pellets gefressen worden sind
- zurückgelegte Gesamtstrecke
- Anzahl gefressener Pellets vor dem ersten Fehler
- Zeit bis zum Begehen des ersten Fehlers.

Ein Lauf wurde beendet, wenn

- alle 8 Pellets gefressen oder
- 16 Fehler gemacht wurden oder
- 10 Minuten erfolglos vergangen waren.

Mit den Tieren wurden die eigentlichen Versuchsläufe erst dann durchgeführt, wenn während des Trainings an drei aufeinander folgenden Tagen die Laufzeit maximal 60 sec. betrug und nicht mehr als ein Fehler begangen wurde.

Nach einem Versuch hatten die Tiere eine Pause von 2-3 Monaten, die sie unter o. g. standardisierten Bedingungen, einschließlich Futter ad libitum, verbrachten. Danach

wurden sie für einen erneuten Versuch zurück ins Labor gebracht. Die letzten Versuche absolvierten die Tiere im Alter von 12 Monaten.

5.4.2 Versuchsläufe

Nachdem die Tiere das Training erfolgreich absolviert hatten, nahmen sie an den eigentlichen Versuchsläufen teil. Es erfolgten Läufe vor sowie 20, 60 und 180 min. nach Applikation der Versuchssubstanz. Alle unter 5.4.1 aufgelisteten Kriterien wurden während der einzelnen Versuchsläufe registriert, wobei die Gesamtfehleranzahl, die Gesamtlaufzeit und die Anzahl fehlerfrei gefressener Pellets grafisch dargestellt wurden.

5.4.2.1 Wirkung von Scopolamin und Tacrin an der Ratte

In vorangegangenen Versuchen zur Dosisabhängigkeit wurde bereits eine Scopolamin-dosis von 0,05 mg/100 g KM als geeignet ermittelt. Bei dieser Dosis waren die Tiere in ihren kognitiven Leistungen deutlich beeinträchtigt, aber nicht so sehr in ihrem Verhalten gedämpft, dass sie sich nicht mehr im Labyrinth bewegen konnten. Tacrin wurde in den Versuchen als Referenzsubstanz eingesetzt und stellte die Positivkontrolle dar. Hierfür wurden ebenfalls Versuche zur Dosisabhängigkeit durchgeführt. Dabei wurde das Verhalten der Ratten nach gleichzeitiger Gabe von Tacrin und Scopolamin untersucht. Tacrin wurde in Dosierungen von 0,25 und 0,5 mg/100 g KM mit Scopolamin in unterschiedlichen Zeitabständen appliziert.

5.4.2.2 Wirkung der neuen Testsubstanzen

Es wurden die 6 Substanzen (siehe Tab. 1) hinsichtlich ihrer Wirkung bei Scopolamin-bedingter Einschränkung der ZNS-Funktion der Ratte untersucht. Die Testsubstanzen wurden in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst und equimolar zur als optimal ermittelten Tacrindosis von 2 μ mol/100 g KM verwendet. Außerdem wurde jede Substanz allein getestet, um ihre Auswirkung auf das Verhalten der Tiere im Labyrinth zu erfassen.

Während der Versuchsreihen, in denen die neuen Substanzen zusammen mit Scopolamin appliziert wurden, erfolgte für jede Substanz ein Vergleich mit einer jeweils eigenen Scopolamin-Gruppe. Wie in den Versuchen mit Tacrin, fand der erste Versuchslauf im Radial Maze 20 Minuten nach Substanzgabe, der zweite nach 60 Minuten und ein weiterer nach 180 Minuten statt. Dabei wurde erneut die Zeit registriert, nach der der

erste Fehler begangen wurde, die Anzahl der Pellets, die die Ratte bis zu diesem Zeitpunkt gefressen hatte und die Zeit, in der alle Pellets gefressen wurden.

Zusätzlich wurde die Hepatotoxizität von FL16 und FL38 bei einer Dosierung von 6 µmol/100 g KM untersucht. Diese Dosierung entspricht der dreifachen Stoffmenge, die in den Labyrinthversuchen appliziert wurde. Es wurde ASAT, LDH und Albumin in einem Laborautomaten mittels Routinemethoden bestimmt. Für die Bereitstellung der im Ergebnisteil (siehe Tab. 2) dargestellten Befunde danke ich Herrn Dr. med. Dr. rer. nat. M. Kiehntopf, Komm. Direktor des Institutes für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Klinikums der FSU Jena.

5.5 Statistische Auswertung

Es wurden arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler berechnet. Des Weiteren wurde untersucht, ob sich ein statistischer Zusammenhang zwischen zwei Parametern herstellen lässt. Um die Stärke des Zusammenhangs zu ermitteln, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Ein empirisch ermittelter Koeffizient, dessen Betrag größer 0 ist, besagt, dass ein Zusammenhang zwischen beiden Parametern nicht auszuschließen war. Zur Analyse statistischer Unterschiede wurde der zweiseitige t-Test herangezogen. Es wurden die 2-seitigen p-Werte berechnet und mit 0,05 verglichen. Dies bedeutet, dass ein Unterschied beziehungsweise Zusammenhang mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p \leq 0,05$) als statistisch signifikant gewertet wird. Das Datenmanagement und die statistische Auswertung wurden mit dem Programm SPSS für Windows Version 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die Anzahl der Tiere (n) betrug 12-15 pro Gruppe.

6. Ergebnisse

6.1 Ermittlung der Dosis und des Applikationszeitpunktes von Tacrin

Zum Erzielen anticholinerger Effekte wurde das Scopolaminmodell angewendet. Die Kriterien Gesamtfehleranzahl, Gesamtlaufzeit und Anzahl fehlerfrei gefressener Pellets/sec., die 20 und 60 Minuten nach Scopolamin-Applikation gemessen worden sind, waren signifikant im Vergleich zu den Kontrollwerten vor Scopolamingabe („0 min.“) verändert (siehe Abb. 3). Für die Anzahl der fehlerfrei gefressenen Pellets/sec. konnte dies ebenfalls nach 180 min. beobachtet werden. Der deutlichste Scopolamineffekt trat erwartungsgemäß nach 20 min. auf. Zu diesem Zeitpunkt machten die Ratten die meisten Fehler (5 ± 1), benötigten die längste Gesamtlaufzeit (181 ± 29 sec.) und fraßen die geringste Anzahl Pellets fehlerfrei ($0,08 \pm 0,02$ Pellets/sec.). Nach 180 min. war der Scopolamineffekt im Wesentlichen nicht mehr nachweisbar, so dass zu diesem Zeitpunkt auch keine Wirkung der neuen Substanzen zu erwarten war. Es stellte sich heraus, dass die Wirkung von Tacrin an der mit Scopolamin vorbehandelten Ratte entscheidend vom Zeitraum zwischen den Applikationen von Scopolamin und Tacrin sowie von der Tacrindosis abhing (siehe Abb. 4). Es erwies sich als günstig, 0,5 mg (entspricht ~ 2 μ mol) Tacrin/100 g KM 10 Minuten nach Scopolamin zu applizieren. 20 min. danach fand der erste Versuchslauf statt. Abb. 3 zeigt, dass nach 20 und 60 Minuten eine signifikante Verminderung der Gesamtfehleranzahl und der Gesamtlaufzeit sowie ein signifikanter Anstieg fehlerfrei gefressener Pellets/sec. nach 60 und 180 min. bei den zusätzlich mit Tacrin behandelten Tieren gegenüber der Scopolamin-Gruppe zu beobachten war. Daher wurde zur Untersuchung der neuen Tacrinderivate eine zur Abb. 3 analoge Versuchsanordnung verwendet. Für die Überlassung der in Abb. 3 und Abb. 4 dargestellten Messwerte danke ich Frau Dr. med. D. Appenroth, Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Klinikums der FSU Jena.

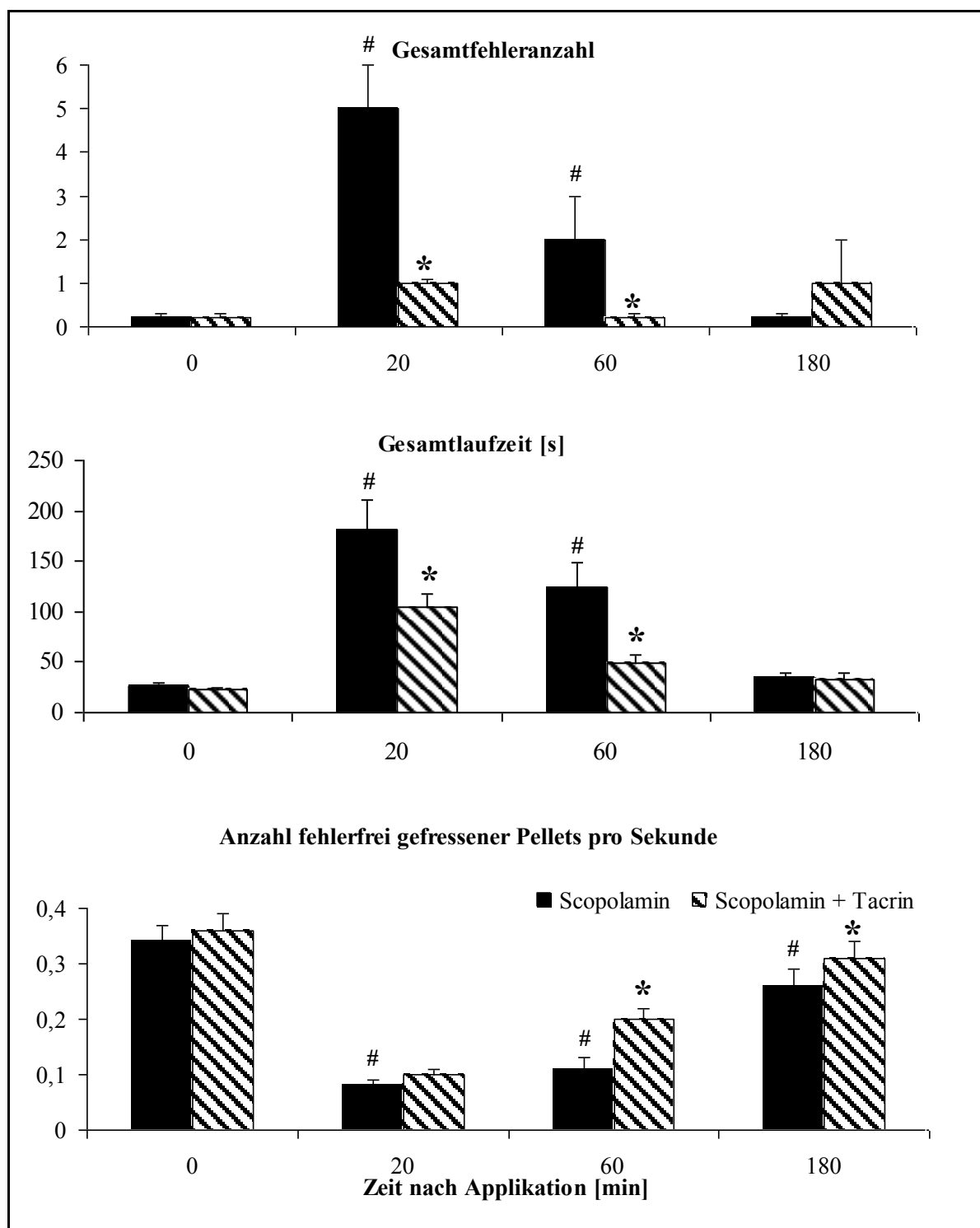


Abb. 3: Einfluss von Tacrin (Tac) ($2,0 \mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$, appliziert 10 min. nach Scopolamin (Scop)) auf die durch Scop ($0,114 \mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$) beeinträchtigte Kognitionsleistung der Ratte im Radial Maze. Arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 12$;
 *: signifikanter Unterschied zu Scop ($p \leq 0,05$)
 #: signifikanter Scopolamineffekt ($p \leq 0,05$)

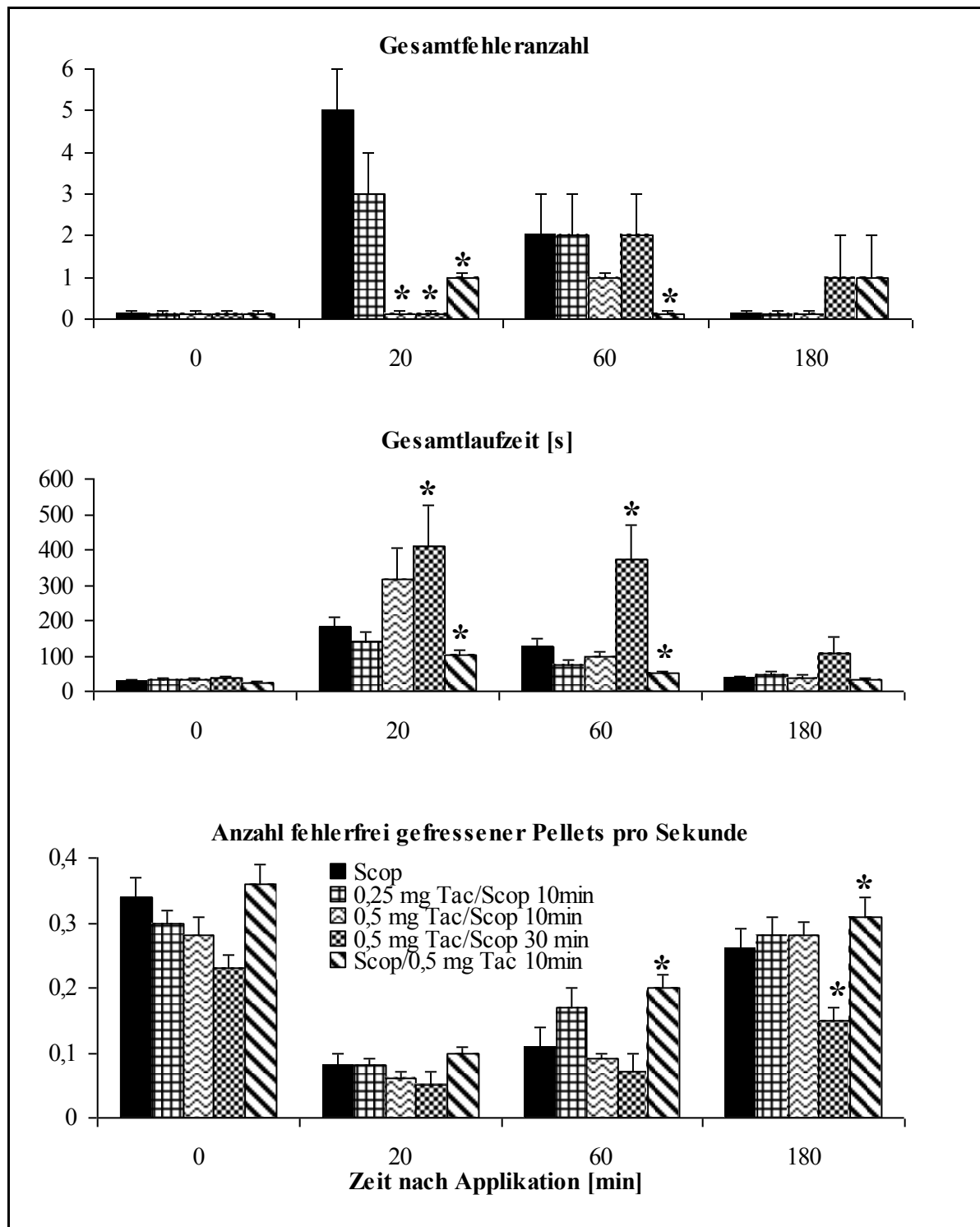


Abb. 4: Einfluss von Tac (unterschiedliche Dosierung und unterschiedlicher zeitlicher Abstand zu Scop (0,114 $\mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$) beeinträchtigte Kognitionsleistung der Ratte im Radial Maze. Arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 6-12$; *: signifikanter Unterschied zu Scop ($p \leq 0,05$)

6.2 Wirkungen der neu synthetisierten Tacrinderivate

6.2.1 *In vitro*-Aktivität und Selektivität

Die neuen Substanzen wurden equimolar zum Tacrinhydrochlorid (2 $\mu\text{mol}/100\text{ g KM}$) dosiert. Die durch Herrn Prof. Dr. Michael Decker (Institut für Pharmazie der FSU Jena) mittels der Ellman-Analyse (Ellman et al. 1961) durchgeführten *in vitro*-Messungen der inhibitorischen Aktivitäten zeigten, dass die neu synthetisierten Substanzen bezüglich der AChE-Hemmung eine etwas höhere *in vitro*-Aktivität als Tacrin aufwiesen (siehe Tab. 1). Die Hemmung der BuChE war bei den neu synthetisierten Tacrinderivaten im Vergleich zu Tacrin geringer. Es zeigte sich, dass alle neuen Tacrinderivate die AChE stärker hemmen als die BuChE.

6.2.2 Wirkungen der neuen Substanzen *in vivo* - Betrachtung der Fehler und Laufzeit

6.2.2.1 FL16 und FL98

In Abb. 5 und Abb. 6 ist zu erkennen, dass sowohl das Amid FL16 als auch das Amin FL98 bezüglich der Gesamtfehleranzahl und der Gesamtlaufzeit den Scopolamineffekt fast vollständig aufheben. Bezüglich der Anzahl fehlerfrei gefressener Pellets/sec. wird dies nur tendenziell sichtbar. Das Ausmaß dieses Antagonismus entspricht in etwa dem des Tacrins (siehe Abb. 3). Erwartungsgemäß sind die Effekte 20 min. nach Gabe von FL16 und FL98 am deutlichsten ausgeprägt. Gegenüber der alleinigen Scopolamin-Applikation ist die Gesamtfehleranzahl nach 20 min. signifikant reduziert. Außerdem absolvieren die Ratten den Lauf im Labyrinth nach Gabe sowohl von FL16 als auch von FL98 nach 20 und 60 min. signifikant schneller im Vergleich zu den Scopolamin-behandelten Tieren. Die Berechnung der fehlerfrei pro Sekunde gefressenen Pellets ergab für FL16 und FL98 60 min. nach Substanzgabe eine signifikante Verbesserung der durch Scopolamin beeinträchtigten Kognitionsleistung. Die geringste Gesamtfehleranzahl ($0,25 \pm 0,18$), die kürzeste Gesamtlaufzeit ($28 \pm 2\text{ sec.}$) sowie die meisten fehlerfrei gefressenen Pellets/sec. ($0,29 \pm 0,03$) wurden 180 min. nach Applikation in der FL16-Gruppe registriert (siehe Abb. 5). Zu diesem Zeitpunkt waren die Ausgangswerte, die vor der Applikation ermittelt wurden, wieder erreicht.

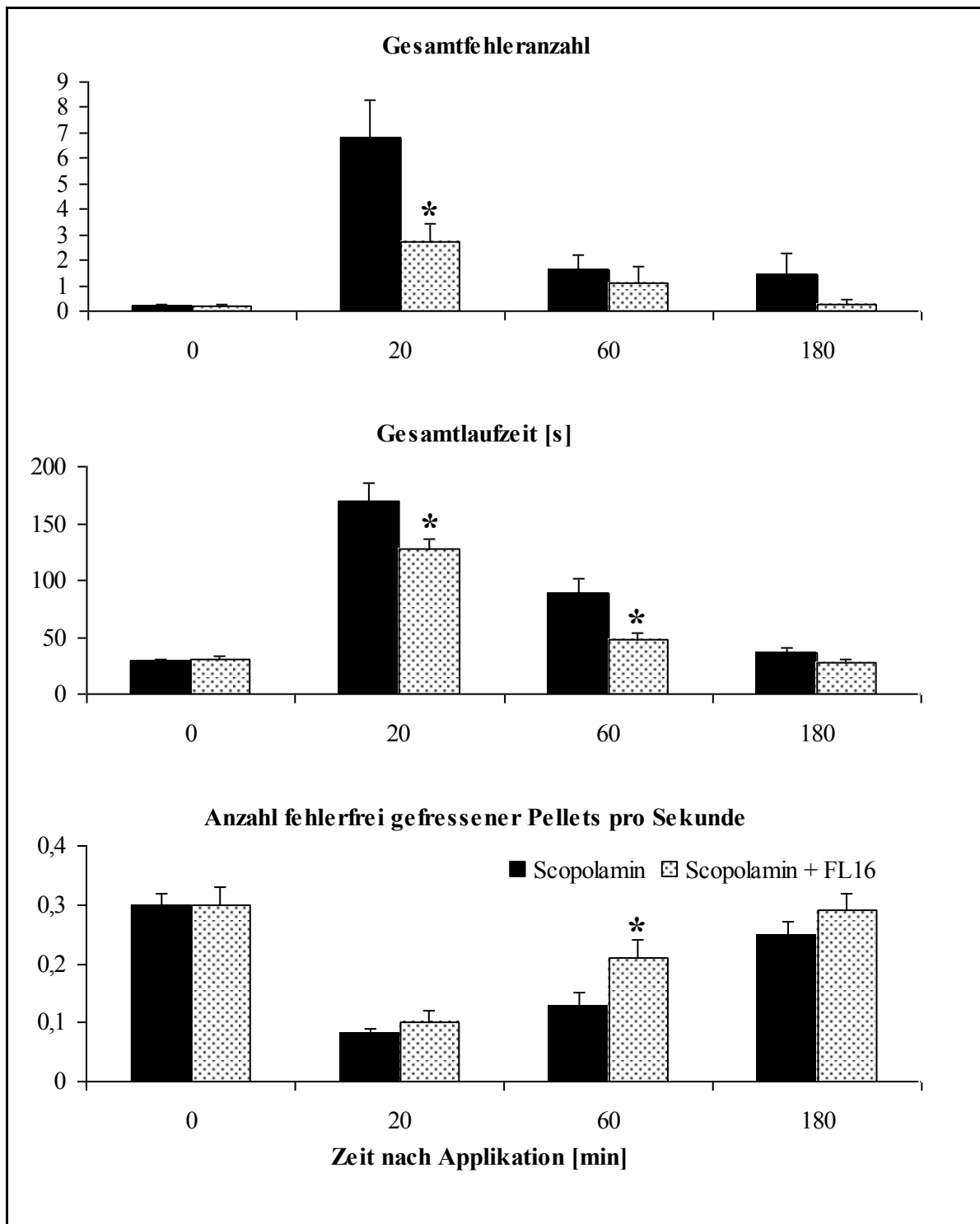


Abb. 5: Einfluss von FL16 ($2,0 \mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$, appliziert 10 min. nach Scop) auf die durch Scop ($0,114 \mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$) beeinträchtigte Kognitionsleistung der Ratte im Radial Maze. Arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 12$;
*: signifikanter Unterschied zu Scop ($p \leq 0,05$)

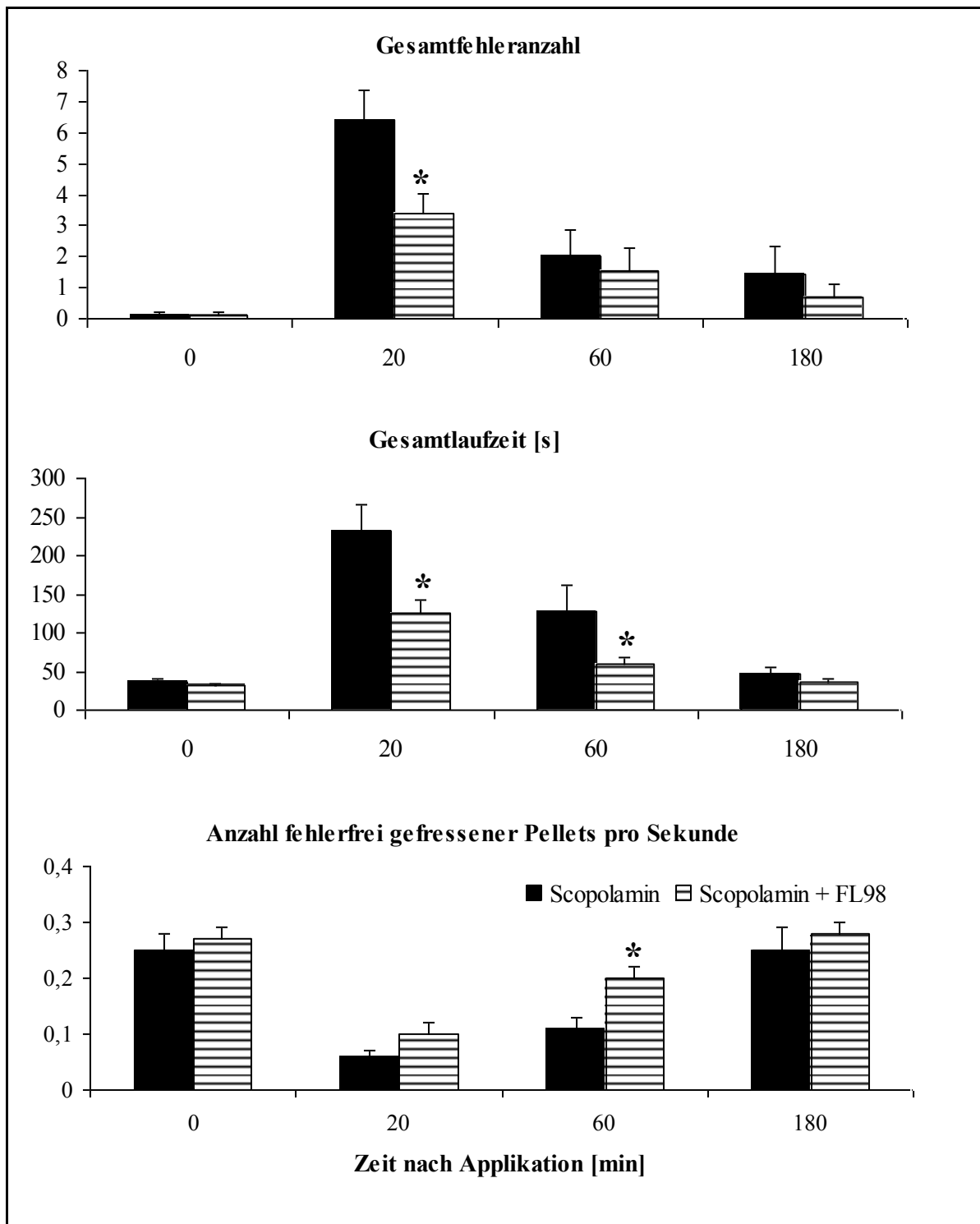


Abb. 6: Einfluss von FL98 (2,0 $\mu\text{mol}/100\text{ g KM}$, appliziert 10 min. nach Scop) auf die durch Scop (0,114 $\mu\text{mol}/100\text{ g KM}$) beeinträchtigte Kognitionsleistung der Ratte im Radial Maze. Arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 14$;
*: signifikanter Unterschied zu Scop ($p \leq 0,05$)

6.2.2.2 FL38

Das Amin FL38 konnte den Scopolamineffekt bezüglich der Gesamtfehleranzahl, der Gesamtlaufzeit und der Anzahl fehlerfrei gefressener Pellets/sec. fast vollständig aufheben (siehe Abb. 7). Die Effekte waren 20 min. nach Gabe von FL38 am deutlichsten ausgeprägt. Gegenüber der alleinigen Scopolamin-Applikation war die Gesamtfehleranzahl und die im Labyrinth benötigte Laufzeit im Vergleich zu mit Scopolamin behandelten Tieren nach 20 und 60 min. signifikant reduziert. Zudem ergab die Messung der fehlerfrei pro Sekunde gefressenen Pellets zum Zeitpunkt 60 min. nach Gabe von FL38 eine signifikante Verbesserung der durch Scopolamin beeinträchtigten Kognitionsleistung. Wie in den Versuchen mit FL16 und FL98 waren nach 180 min. die Ausgangswerte in allen Versuchsgruppen wieder erreicht worden.

6.2.2.3 FL99 und NO-Donator

Wie den Abb. 8 und 9 zu entnehmen ist, hat sowohl die alleinige Gabe von FL99 (Analogon der Substanz FL38, welches jedoch keine Nitratgruppe besitzt) als auch die Verabreichung des NO-Donators allein keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtfehleranzahl, Gesamtlaufzeit und die Anzahl der fehlerfrei gefressenen Pellets/sec. bei Scopolamin-behandelten Ratten. Dies trifft ebenso für die gleichzeitige Applikation von FL99 und dem NO-Donator zu (siehe Abb. 10). Auf eine detaillierte Befunddarstellung kann daher verzichtet werden.

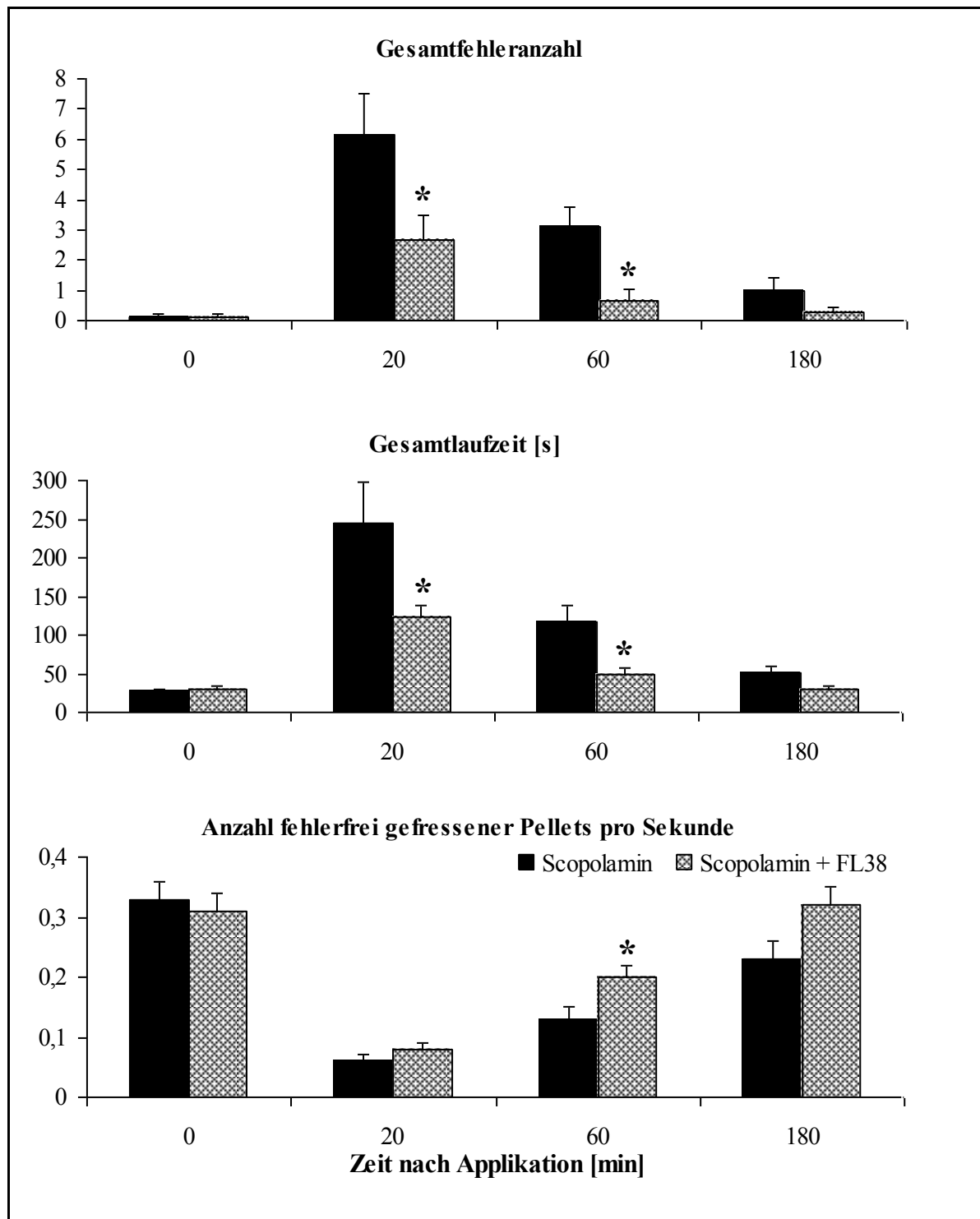


Abb. 7: Einfluss von FL38 ($2,0 \mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$, appliziert 10 min. nach Scop) auf die durch Scop ($0,114 \mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$) beeinträchtigte Kognitionsleistung der Ratte im Radial Maze. Arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 12$;
*: signifikanter Unterschied zu Scop ($p \leq 0,05$)

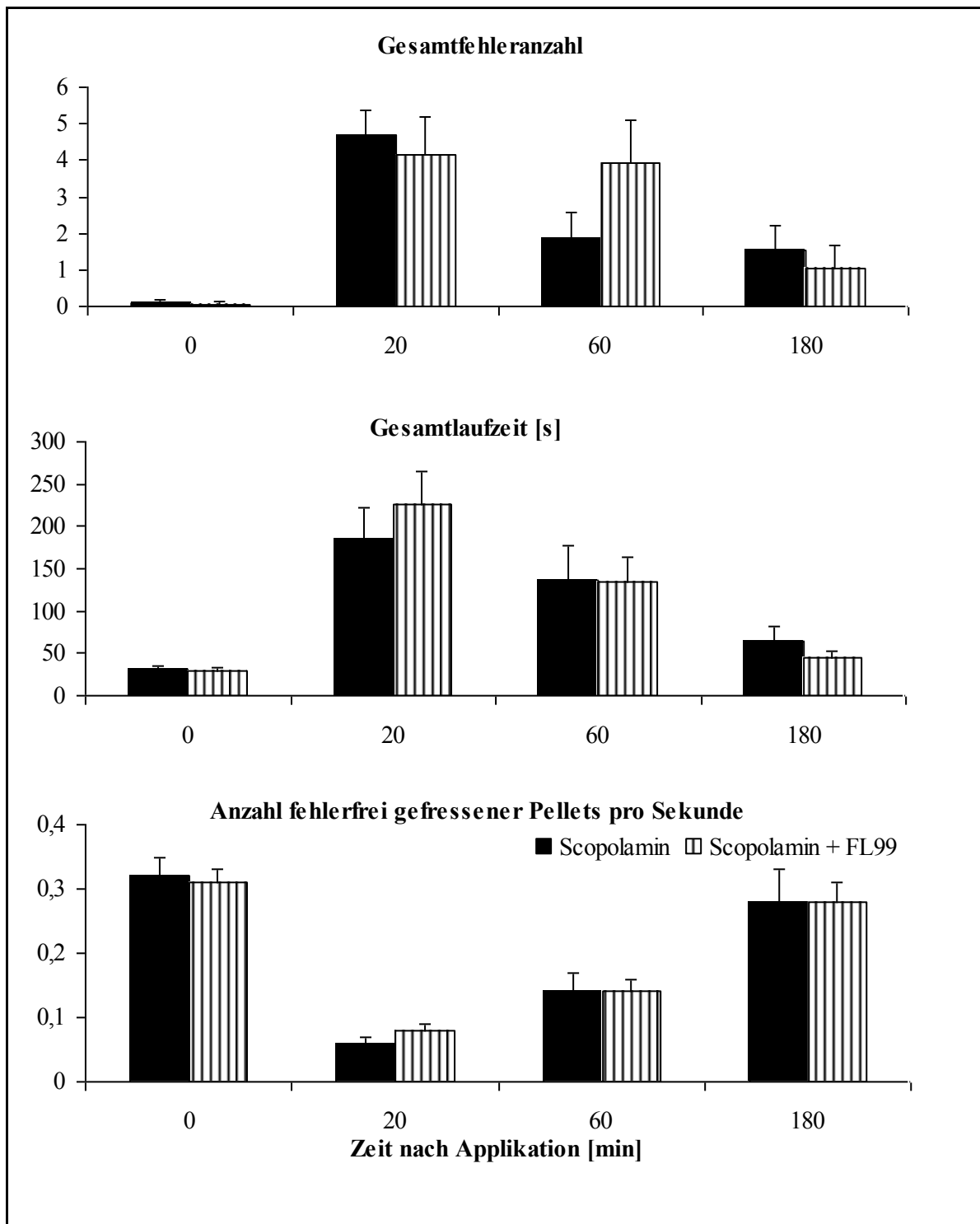


Abb. 8: Einfluss von FL99 (2,0 $\mu\text{mol}/100$ g KM, appliziert 10 min. nach Scop) auf die durch Scop (0,114 $\mu\text{mol}/100$ g KM) beeinträchtigte Kognitionsleistung der Ratte im Radial Maze. Arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 15$

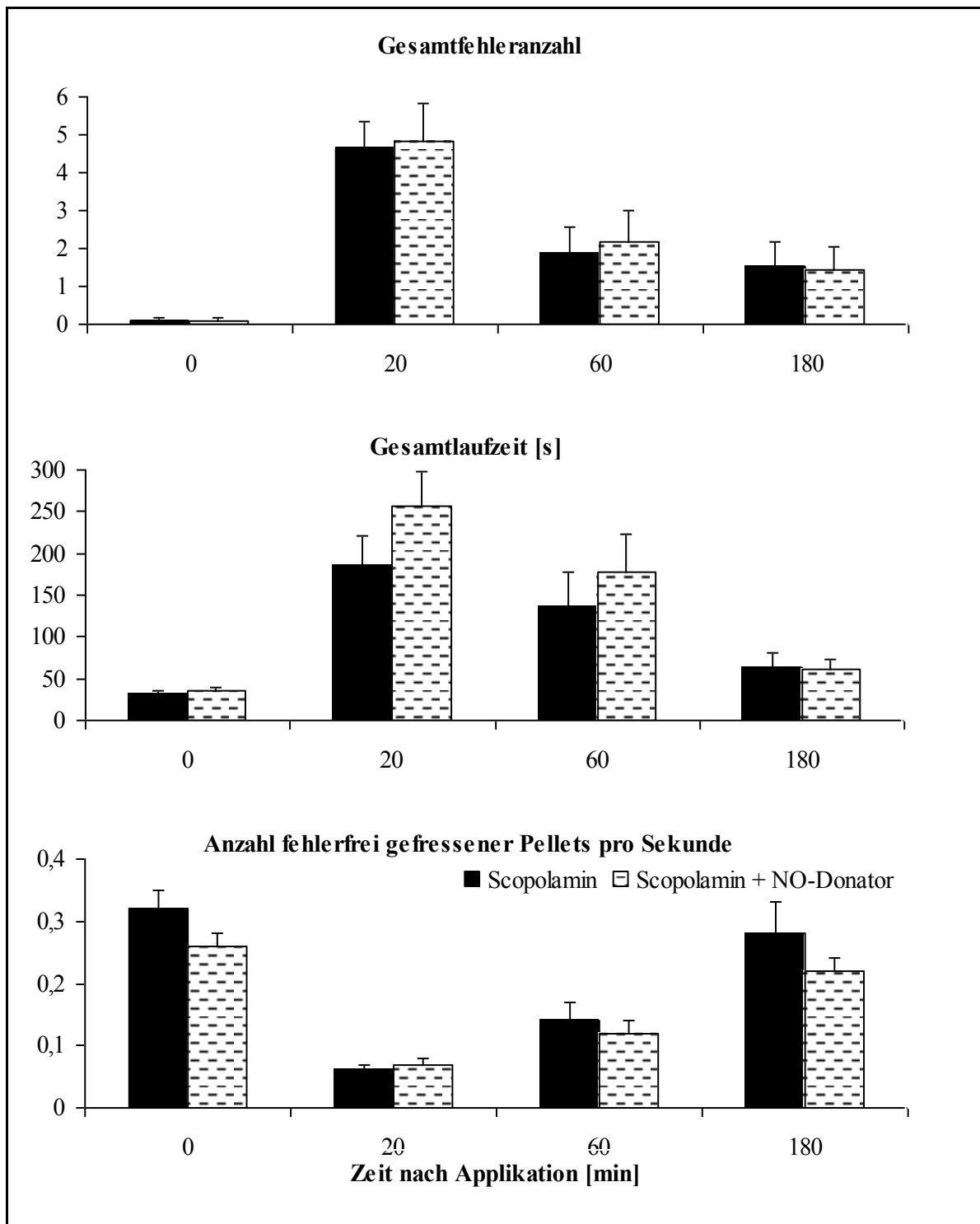


Abb. 9: Einfluss des NO-Donators ($2,0 \mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$, appliziert 10 min. nach Scop) auf die durch Scop ($0,114 \mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$) beeinträchtigte Kognitionsleistung der Ratte im Radial Maze. Arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 12$

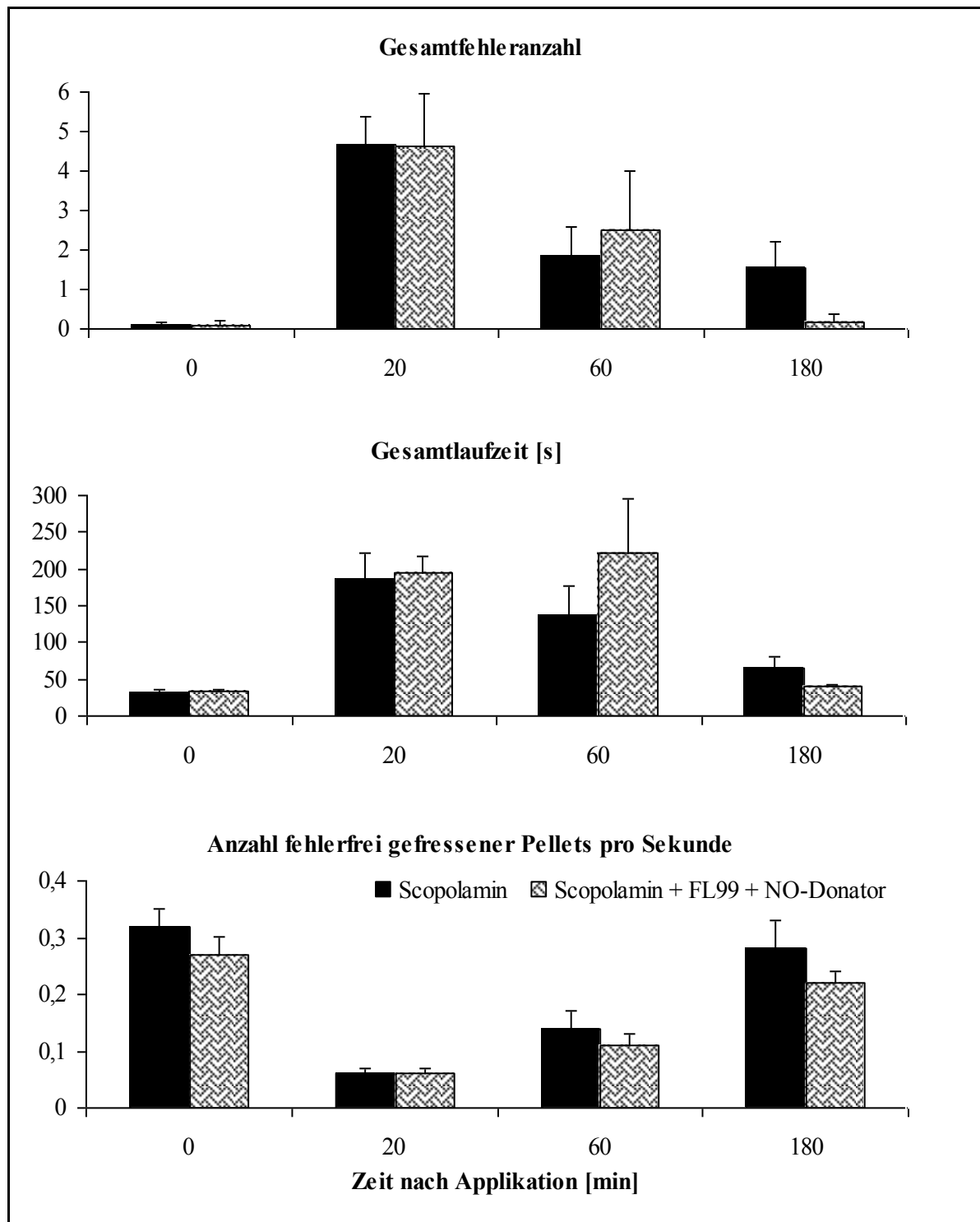


Abb. 10: Einfluss von FL99 + NO-Donator ($2,0 \mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$, appliziert 10 min. nach Scop) auf die durch Scop ($0,114 \mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$) beeinträchtigte Kognitionsleistung der Ratte im Radial Maze. Arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 12-15$

6.2.2.4 Vergleich von FL99, NO-Donator und FL38

FL99 ist ein Analogon der Substanz FL38, welches im Gegensatz zu FL38 keine Nitratgruppe besitzt. Abb. 11 zeigt die Wirkung von FL38 auf die Scopolamin-induzierte Kognitionsverminderung im Vergleich mit FL99, dem NO-Donator sowie der gleichzeitigen Applikation von FL99 und dem NO-Donator. Die Scopolaminwerte stammen aus den Versuchen mit FL99 und dem NO-Donator (siehe 6.2.2.3).

FL38 konnte den Scopolamineffekt als einzige der in Abb. 11 dargestellten Substanzen, nach 20 und 60 min. fast vollständig aufheben. Es ist somit zu vermuten, dass der Nitratgruppe, neben einem vasorelaxierenden Effekt und dem Einfluss auf die Lipophilie (log P), eine Schlüsselrolle bei der Interaktion von FL38 mit der AChE zukommt.

6.2.2.5 Zusammenfassende Darstellung der Wirkung von Tacrin, FL16, FL38 und FL98

Abb. 12 fasst Tacrin und alle neuen Tacrinderivate, die eine Aufhebung der Scopolamin-induzierten Kognitionsverminderung bewirken konnten, zusammen. Da zu jeder Substanz separate Scopolamin-behandelte Tiere mitgeführt worden sind, wurden die Scopolaminwerte aus Abb. 3 als Vergleich mit eingezeichnet. Betrachtet man die Gesamtfehleranzahl 20 min. nach Applikation, so antagonisiert Tacrin offensichtlich am stärksten den Scopolamineffekt. Zwischen den neuen Tacrinderivaten und Tacrin ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Scopolamin-Antagonismus nachweisen. Die drei neuen Tacrinderivate wirken im Vergleich zu Tacrin jedoch deutlich geringer. Sie sind bezüglich ihrer Auswirkungen auf die Gesamtfehleranzahl gleichermaßen gut wirksam. 60 min. nach Applikation nähern sich die Werte der Gesamtfehleranzahl wieder dem Ausgangsbereich (0 min.) an und erreichen nach 180 min. wieder fast völlig die Kontrollwerte.

Die Gesamtlaufzeiten wurden durch Tacrin und die drei neuen Tacrinderivate in gleicher Weise beeinflusst: Alle vier Substanzen verkürzten 20 und 40 min. nach Applikation signifikant die Laufzeiten der Scopolamin-behandelten Ratten. Nach 180 min. sind alle Laufzeiten wieder auf dem Niveau unbehandelter Kontrolltiere.

Nahezu spiegelbildlich zur Gesamtfehleranzahl und zur Laufzeit verhält sich die Anzahl fehlerfrei gefressener Pellets/sec. Am deutlichsten wird der kognitionsverbessernde Effekt von Tacrin und den drei neuen Tacrinderivaten 60 min. nach Applikation. Zu diesem Zeitpunkt ist die Anzahl fehlerfrei gefressener Pellets/sec. signifikant höher als in der Scopolamin-Gruppe.

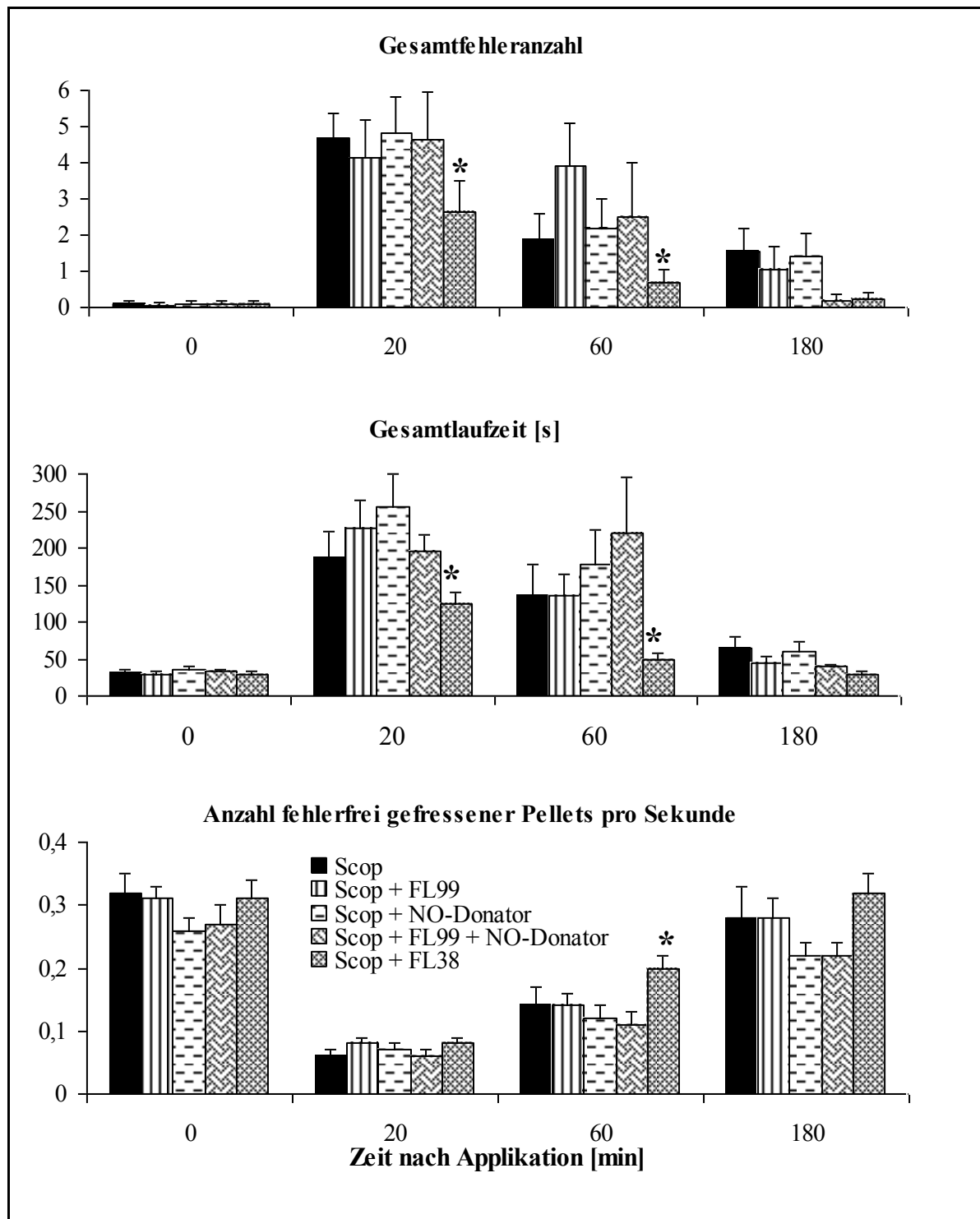


Abb. 11: Einfluss von FL99, NO-Donator, FL99 + NO-Donator und FL38 (2,0 $\mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$, appliziert 10 min. nach Scop) auf die durch Scop (0,114 $\mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$) beeinträchtigte Kognitionsleistung der Ratte im Radial Maze. Arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 12-15$;

*: signifikanter Unterschied zu Scop ($p \leq 0,05$)

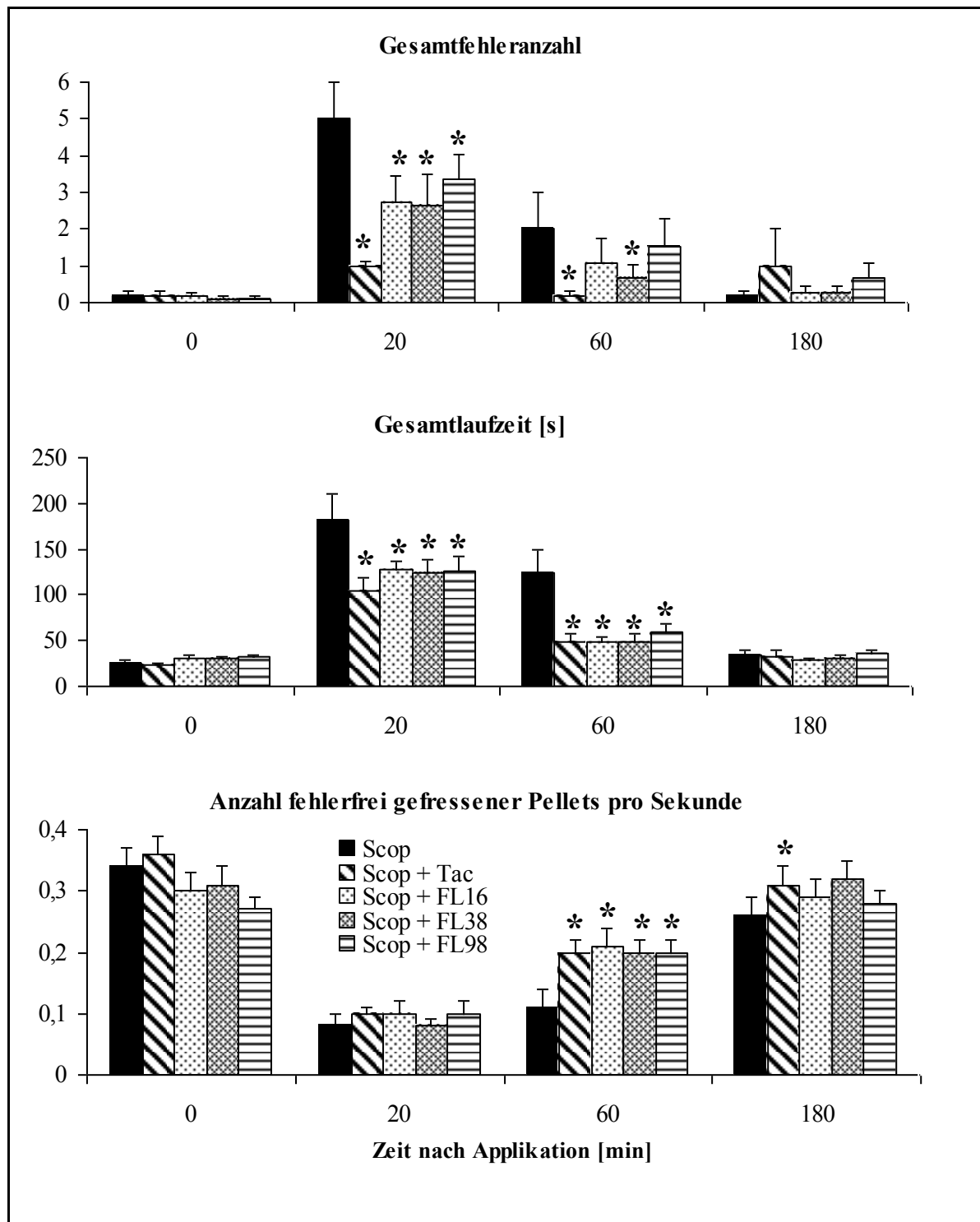


Abb. 12: Einfluss von Tacrin, FL16, FL38 und FL 98 ($2,0 \mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$, appliziert 10 min. nach Scop) auf die durch Scop ($0,114 \mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$) beeinträchtigte Kognitionsleistung der Ratte im Radial Maze. Arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 11-15$; *: signifikanter Unterschied zu Scop ($p \leq 0,05$)

6.2.2.6 FL15

Wie der Abb. 13 zu entnehmen ist, hat das Tacrinderivat FL15 (ein Amid, bei dem über die Alkylendiamin-Seitenkette eine Verknüpfung zu einem 4-hydroxy-3-Methoxyphenyl-Ring der Ferulasäure besteht) keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtfehleranzahl, Gesamtlaufzeit und die Anzahl der fehlerfrei gefressenen Pellets/sec. bei Scopolamin-behandelten Ratten. Somit wurde die Tacrinwirkung durch die Derivatisierung von Tacrin und Ferulasäure aufgehoben. Auf eine detaillierte Befunddarstellung kann daher verzichtet werden. Allerdings lässt sich auch hier 20 min. nach Applikation bezüglich der Gesamtfehlerzahl eine Tendenz zur Verbesserung der durch Scopolamin eingeschränkten Kognitionsleistung erkennen. Diese ist um 37% vermindert.

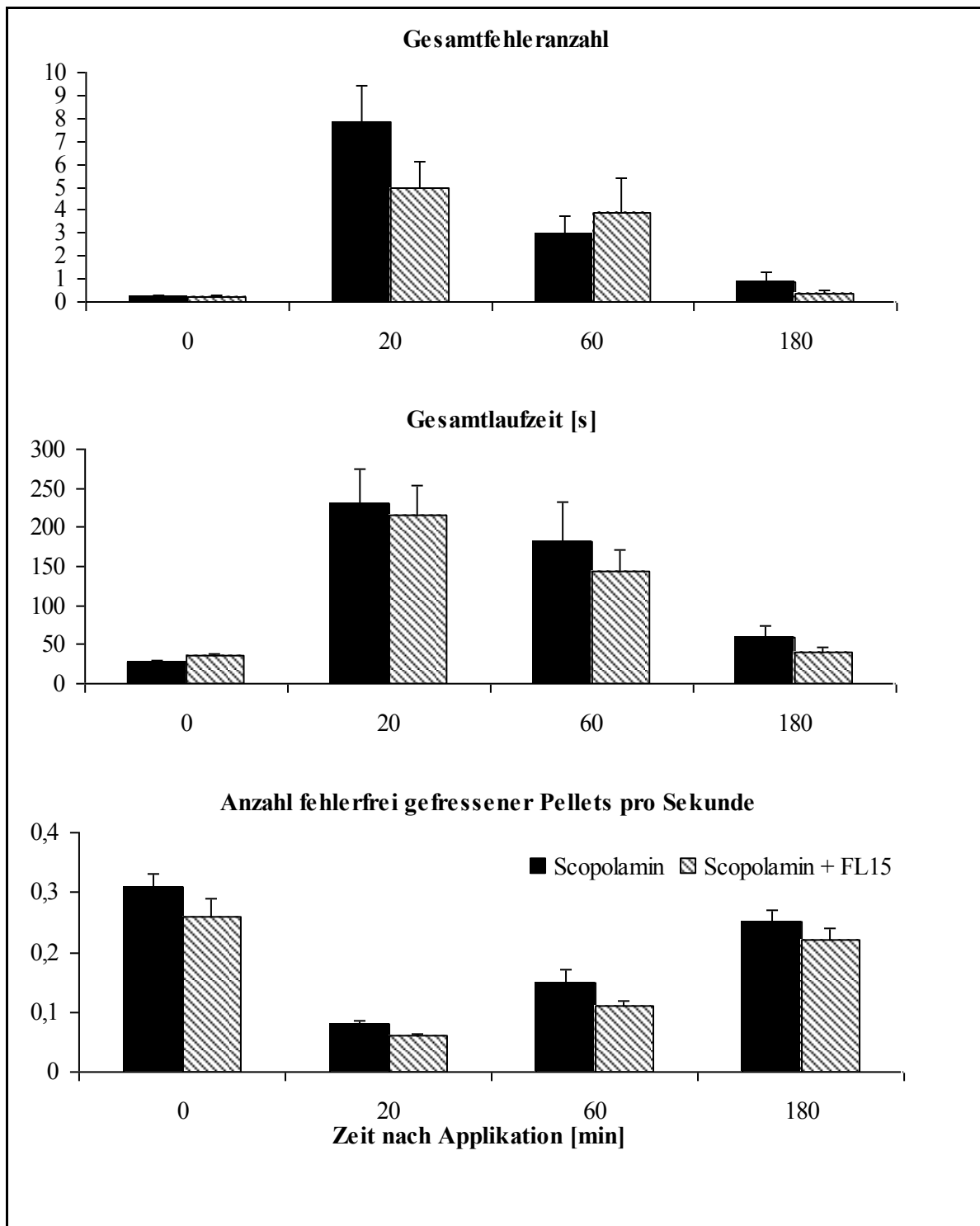


Abb. 13: Einfluss von FL15 ($2,0 \mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$, appliziert 10 min. nach Scop) auf die durch Scop ($0,114 \mu\text{mol}/100 \text{ g KM}$) beeinträchtigte Kognitionsleistung der Ratte im Radial Maze. Arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 14$

6.3 Hepatotoxizität - Vergleich der NO-Tacrinderivate FL16 und FL38 mit Tacrin

Nachdem herausgefunden worden war, dass drei der neuen Tacrinderivate bezüglich ihres kognitionsverbessernden Effekts durchaus mit Tacrin vergleichbar sind, wurde in weiterführenden Untersuchungen die Hepatotoxizität der beiden am besten wirksamen Tacrinderivate, FL16 und FL38, mit der des Tacrins verglichen, um einen Hinweis zu erhalten, ob die neuen Substanzen bei einer möglichen klinischen Anwendung vom Patienten besser vertragen werden als das hepatotoxische Tacrin (Jones 2003). Die dabei verwendete Dosis von 6 $\mu\text{mol}/100\text{ g KM}$ entspricht der dreifachen Stoffmenge, die in den Labyrinthversuchen appliziert wurde. In Tab. 2 sind einige Laborparameter zur Charakterisierung der Substanzwirkungen auf die Leberfunktion dargestellt. Es wurden die Serum-Aktivitäten von ASAT und LDH, die Albuminkonzentration im Blut und die Gesamtproteinkonzentration im Lebergewebe vor und zu verschiedenen Zeiten nach Applikation gemessen.

Für Tacrin ließ sich die bekannte Hepatotoxizität bestätigen. Diese zeigte sich in einem Anstieg der ASAT nach 12 h und in einer Zunahme der LDH-Aktivität nach 20 h. Zudem ließ sich die Leberschädigung nach Tacrin durch eine Abnahme der Albuminkonzentration im Blut nach 20 und 36 h (Minimalwert) sowie eine Verminderung des Proteingehalts im Lebergewebe nach 36 h objektivieren.

Die Tacrinderivate FL16 und FL38 riefen im Gegensatz zu Tacrin keine signifikante Veränderung der in Tab. 2 dargestellten Parameter hervor, auch wenn man berücksichtigt, dass die Proteinkonzentrationen im Lebergewebe aller mit FL16 behandelten Tiere zu allen Zeitpunkten auffallend niedrig bestimmt worden sind.

Tab. 2: Einfluss der höchsten, noch tolerierten Tacrindosis (6 µmol/100 g KM) und equimolarer Dosierungen von FL16 und FL38 auf ausgewählte Laborparameter.[#]

Arithmetische Mittelwerte ± S.E.M.; n = 3-6; n.b. = nicht bestimmt

*: signifikanter Unterschied zu Kontrolltieren (d. h. zum Zeitpunkt 0 h) ($p \leq 0,05$)

Substanz/ Zeiten nach Applikation [h]	ASAT [µmol/l]	LDH [µmol/s]	Albumin im Serum [g/l]	Gesamtprotein im Lebergewebe [mg/g]
Tacrin/				
0 h	2,5 ± 0,3	4,2 ± 0,8	16,3 ± 0,5	138 ± 1
12 h	4,5 ± 0,8*	5,5 ± 0,9	16,0 ± 0,4	n.b.
20 h	3,4 ± 0,3	10,0 ± 3,2*	15,0 ± 0,2*	118 ± 4
36 h	3,1 ± 0,4	6,5 ± 1,5	13,1 ± 0,3*	92 ± 2*
FL16/				
0 h	2,4 ± 0,3	5,4 ± 0,6	14,6 ± 0,4	63 ± 1
12 h	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
20 h	2,7 ± 0,2	5,2 ± 0,4	13,6 ± 0,4	66 ± 2
36 h	2,0 ± 0,2	3,5 ± 0,5	15,0 ± 0,6	72 ± 1
FL38/				
0 h	2,1 ± 0,2	4,6 ± 0,6	16,7 ± 0,5	n.b.
12 h	2,3 ± 0,2	4,4 ± 0,6	16,6 ± 0,6	n.b.
20 h	2,8 ± 0,4	5,6 ± 0,3	17,1 ± 0,3	143 ± 1
36 h	2,1 ± 0,2	4,1 ± 0,4	15,1 ± 0,4	123 ± 9

[#] Für die Bestimmung der Laborparameter danke ich Herrn OA Dr. med. Dr. rer. nat. Michael Kiehntopf, Komm. Direktor des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Klinikums der FSU Jena und seinen MitarbeiterInnen sowie Frau PD Dr. med. A. Lupp, Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Klinikums der FSU Jena.

7. Diskussion

Es sollte die Wirkung von fünf neuen, am Institut für Pharmazie der FSU Jena synthetisierten Tacrinderivaten auf die durch Scopolamin reduzierte Kognitionsleistung der Ratte im 8-Arm-Radial Maze untersucht werden. Dabei war zu prüfen, ob die neuen Substanzen die durch Scopolamin bedingte Einschränkung des Arbeitsgedächtnisses im Vergleich zu Tacrin genauso oder möglicherweise noch besser als Tacrin reduzieren können. Anschließend wurde die Hepatotoxizität zweier Substanzen, FL16 und FL38, die sich im Labyrinth als wirksam erwiesen hatten, im Vergleich zu der des Tacrins anhand der Parameter ASAT, LDH und Albumin im Blut sowie der Gesamtproteinkonzentration im Lebergewebe bestimmt (siehe 6.3). Ziel war es, Ansätze für neue Medikamente zur Therapie der AD zu finden, die sowohl eine Kognitionsverbesserung hervorrufen, als auch eine geringere Hepatotoxizität als Tacrin aufweisen sollten. Dazu wurde zunächst *in vitro* die Hemmung der AChE- und der BuChE durch die neuen Substanzen sowie deren Lipophilie (log P-Werte) zur Abschätzung ihrer ZNS-Gängigkeit ermittelt und mit Tacrin verglichen (siehe 6.2.1). Für die Labyrinthversuche wurde zuerst ein geeigneter Applikationszeitpunkt für Tacrin (siehe 6.1) bestimmt und analog für die neu synthetisierten Tacrinderivate in Bezug zur Scopolamin-Applikation angewendet. In allen Versuchen wurden die Gesamtfehleranzahl, die Gesamtlaufzeit und die Anzahl der fehlerfrei gefressenen Pellets/sec. als Maß für die Scopolamin-induzierte Kognitionseinschränkung gemessen (siehe 6.2.2). Es sollte vor allem herausgefunden werden, welche Bedeutung die im Molekül enthaltene NO-Gruppe für die Kognitionsverbesserung besitzt, da durch die gleichzeitige Applikation einer NO-Gruppe eine durchblutungssteigernde Wirkung zu vermuten war (Toda et al. 2009a).

7.1 ZNS-Gängigkeit von Scopolamin und Tacrin

In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt, wie sie bereits von anderen Autoren beschrieben worden sind, die ebenfalls Scopolamin zur Induktion kognitiver Defizite (Klinkenberg und Blokland 2010) sowie das 8-armige Radial Maze (Wirsching et al. 1984) verwendet hatten. Die nach der Applikation des Parasympatholytikums Scopolamin zu erwartende, reduzierte Leistung des Arbeitsgedächtnisses (Wirsching et al. 1984) ließ sich durch die signifikant vermehrte Gesamtfehleranzahl und die verlängerte Gesamtlaufzeit vor allem 20 min., aber auch noch 60 min. nach

Scopolamin-Applikation nachweisen. Auch die Anzahl fehlerfrei gefressener Pellets/sec. war 20, 60 und 180 Minuten nach Applikation gegenüber den Kontrollwerten vor Scopolamingabe („0 min.“) signifikant vermindert (siehe Abb. 3). Der Scopolamin-effekt zeigte sich am deutlichsten nach 20 Minuten, was für seine gute ZNS-Gängigkeit spricht (Buccafusco 2004). Aufgrund seines vergleichsweise niedrigen pK_s -Wertes ($pK_s = 7.8$) liegt Scopolamin bei physiologischem pH-Wert als lipidlösliche Base vor und gelangt wegen seiner geringeren Polarität besser in das zentrale Nervensystem als beispielsweise das Anticholinergikum Atropin ($pK_s = 10$) (Lüllmann et al. 2006).

Zwischen der 20. und der 180. Minute nach Applikation kommt es in allen Versuchsgruppen zu einer Abnahme der Gesamtfehleranzahl und einer Verkürzung der Gesamtlaufzeit als Ausdruck der nachlassenden Wirkung. Nach 3 Stunden waren annähernd wieder die Ausgangswerte erreicht, was vor allem durch den Abbau des Scopolamins begründet sein dürfte, da für Scopolamin eine Halbwertszeit (HWZ) von 220 min. (Ebert et al. 1998) beschrieben wird. Außerdem wäre eine Umverteilung des Scopolamins denkbar, was Frey et al. (1992) mit Hilfe eines radioaktiv-markierten Tracers ($[^{11}C]$ Scopolamin) in PET-Studien am Mensch zeigen konnte.

Dass Tacrin die durch Scopolamin verminderte Kognition in den vorliegenden Untersuchungen am besten normalisierte, wenn es 10 min. nach Scopolamin gegeben worden ist, kann durch das ebenfalls rasche Anfluten des Tacrins im ZNS erklärt werden. Telling-Diaz und Lunte (1993) konnten für Tacrin bei Ratten eine sehr schnelle Passage der Bluthirnschranke (BHS) nachweisen. Dabei war die maximale Konzentration im ZNS etwa bereits 60 Minuten nach der intravenösen Tacrin-Applikation zu messen. Die Absorptionshalbwertszeit und die Eliminationshalbwertszeit betrugen hierbei $26,0 \pm 5,2$ min. bzw. $99,1 \pm 17,7$ min.

7.2 Bedeutung der Lipophilie für die Überwindung der Bluthirnschranke (BHS)

Die Lipophilie einer Substanz ist der maßgebliche Faktor für ihren passiven Transport über die BHS (Pike 2009) und spielt daneben eine entscheidende Rolle für die Verteilung, den Metabolismus und die Elimination (Waterhouse 2003). Während polare Substanzen meist nur in geringem Maße ins ZNS übertreten und v. a. parazellulär transportiert werden, gelangen lipophile Substanzen durch transzelluläre Diffusion ihrer ungebundenen, nicht dissoziierten Form über die BHS (Summerfield et al. 2006). Zudem

werden lipophile Substanzen bevorzugt am CYP P450 metabolisiert (Pajouhesh und Lenz 2005), was zu ihrer beschleunigten Ausscheidung führt (Waterhouse 2003).

Ein gebräuchliches Maß für die Lipophilie ist der log P-Wert (Pike 2009), der die Octanol/Wasser-Verteilung der nicht ionisierten Form einer Substanz beschreibt (siehe 7.3). Eine Vorhersage für den log P-Wert kann z.T. durch Kenntnis des MG und des H-Bindungsvermögens einer Substanz getroffen werden (Buchwald und Bodor 1998). Ein weiteres Maß für die Lipophilie ist der log D-Wert (Waterhouse 2003), der die Octanol/Wasser-Verteilung sowohl des ionisierten als auch des nicht ionisierten Zustandes einer Substanz beschreibt (Pike 2009). Der prozentuale Anteil der injizierten Menge einer Substanz, die sich pro Gramm Gehirngewebe anreichert (engl.: percent of injected dose delivered per gram brain = %I.D./g) ist proportional zum Oberflächenpermeabilitätsprodukt (OPP; engl.: permeability surface = PS) der BHS und der Fläche (AUC) unter der Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurve (Pardridge 1997). Zunehmende Lipophilie erhöht zwar das OPP, führt andererseits aber durch die Lipophilie-bedingte Zunahme der Substanz-Verteilung in alle Gewebe zur Reduktion der AUC. Daraus resultierend erreicht man durch Strategien, die die Lipidlöslichkeit eines Pharmakons weiter steigern, nur eine unmerkliche Erhöhung der Aufnahme eines Stoffes (%I.D./g) in das Gehirn (Pardridge 1997).

7.3 ZNS-Gängigkeit der neuen Substanzen

Da sich FL16, FL38 und FL98 als wirksam erwiesen haben, ist bei diesen Substanzen eine ausreichende ZNS-Gängigkeit anzunehmen. Bei FL15, FL99 und dem NO-Donator ist trotz fehlender Wirksamkeit aufgrund der Molekülstrukturen und der daraus ableitbaren physikochemischen Eigenschaften ebenfalls von einer ausreichenden ZNS-Gängigkeit auszugehen. Die log P-Werte der neuen Substanzen sind mit dem des Tacrins (2,63) vergleichbar und liegen mit Ausnahme des NO-Donators (1,29) zwischen 2,12 und 4,02. Sowohl die Amine als auch die Amide besitzen eine protonierbare Bindung und sind somit in der Lage, intramolekulare H⁺-Brückenbindungen auszubilden. Das freie Elektronenpaar des Stickstoffs verleiht Aminen einen nucleophilen Charakter und macht aufgrund der resultierenden Basizität die Anlagerung von Protonen möglich (Latscha et al. 2002). Dies könnte für die BHS-Permeabilität, aber auch für die Interaktion mit Cholinesterasen von Bedeutung sein.

Pang et al. (1996) schreiben einer zwischen zwei Tacrin-Molekülen eingefügten Alkylenkette zunehmende Hydrophobizität im Vergleich mit Tacrin zu, was ebenso für die Alkylendiaminkette der neuen Substanzen zutreffen könnte. Eine NO-Gruppe ist an sich lipophil und begünstigt somit die Bioverfügbarkeit einer Substanz im ZNS (Thatcher et al. 2005). Die durch Herrn Dr. Lei Fang ermittelten log P-Werte zeigen weitestgehend Übereinstimmung mit aus der Literatur zu entnehmenden Daten, die bei Stoffen mit guter ZNS-Gängigkeit beobachtet werden. Die Überwindung der BHS ist bei moderater Lipophilie einer Substanz am besten möglich (Waterhouse 2003). Dies zeigt sich durch eine optimale ZNS-Gängigkeit bei Substanzen, bei denen die log P- bzw. log D-Werte im Bereich von 1,5-3,5 liegen (Pajouhesh und Lenz 2005, Pike 2009).

Das MG der neu synthetisierten Substanzen liegt zwischen 283 Dalton (Da) (FL98) und 431 Da (FL15) und damit etwas über den 253 Da des Tacrinhydrochlorids. Levin (1980) konnte an Hirnkapillaren der Ratte eine gute Permeabilität für Substanzen mit einem MG < 400 Da feststellen. In anderen Arbeiten wird die Obergrenze des MG für eine ausreichende ZNS-Gängigkeit mit bis zu 500 Da angegeben (Pardridge 2003). Da die neu synthetisierten Substanzen alle ein MG in diesem Bereich aufweisen, sind gute Voraussetzungen für die Überwindung der BHS gegeben.

Der Übertritt einer Substanz an der BHS nimmt mit der Anzahl der möglichen H⁺-Brücken ab (Pardridge 2003). Eine geringe H⁺-Bindungskapazität begünstigt die passive Überwindung der BHS (Pike 2009), weswegen die Anzahl der H⁺-Bindungsakzeptoren zur Vorhersage des BHS-Durchtritts genutzt werden kann (Feher et al. 2000). Ihre Zahl sollte ≤ 7 betragen (Pajouhesh und Lenz 2005). Bei den neuen Substanzen sind 3-8 vorhanden. Die Anzahl der H⁺-Donatoren beträgt bei den neuen Substanzen maximal 3, was laut den Literaturempfehlungen ebenso für eine ausreichende ZNS-Gängigkeit spricht (Pajouhesh und Lenz 2005).

Die begrenzte Flexibilität eines Moleküls scheint vorteilhaft für die Überwindung der BHS zu sein, weswegen viele ZNS-Pharmaka maximal 5 frei rotierbare Bindungen besitzen (Pajouhesh und Lenz 2005). Die neu synthetisierten Substanzen weisen zwar bis zu 9 (FL38) frei rotierbare Bindungen im Bereich der Alkylendiamin-Seitenkette auf, was jedoch die ausreichende Permeation in das ZNS nicht zu behindern scheint.

7.4 Pleiotrope Wirkungen der Tacrinderivate

Bei den neuen Tacrinderivaten wären neben der Hemmung der ChE ebenfalls pleiotrope Wirkungen zu erwarten, die auch nach Gabe von Tacrin beobachtet werden. Beispielsweise untersuchten Yamamoto et al. (2007) im Radial Maze die Wirkung von Tacrin auf die durch intraseptale Injektion des GABA_A-Agonisten Muscimol induzierte Kognitionsbeeinträchtigung bei Ratten. Dabei konnte Tacrin die Muscimol-bedingte Beeinträchtigung des Arbeitsgedächtnisses antagonisieren. Die Autoren begründen dies einerseits durch Interaktion des Tacrins im cholinergen System, in dem GABAerge Neurone als Interneurone fungieren. Zum anderen gilt Tacrin als GABA-Antagonist (Li et al. 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Tacrin auch die N-Methyltransferase hemmt und somit auch zu einem Anstieg von Histamin im Gehirn führen kann (Yamamoto et al. 2007). Neben der von Xu et al. (2005) postulierten Beteiligung von Histamin bei kognitiven Prozessen wurde zudem über einen verminderten Histamingehalt im Gehirn von AD-Patienten berichtet (Panula et al. 1998). Beide Befunde könnten die Wirkung von Tacrin in der vorliegenden Arbeit erklären helfen.

Weitere Arbeiten, die über die GABA-antagonistische Wirkung des Tacrin-Homodimer Bis(7)-Tacrin berichten (Li et al. 2007, Zhou et al. 2009), bestärken die Vermutung, dass die neuen Tacrinderivate als GABA-Antagonisten fungieren könnten. Allerdings postulieren Li et al. (2007), dass ein Bis-Tacrin mit kurzer Alkylenkette eine bessere GABA-antagonistische Wirkung als langkettiges Bis-Tacrin besitzt. Die Alkylendi-amin-Seitenkette der neu synthetisierten Substanzen weist eine Länge von 6 (FL98) bis 9 (FL38) Atomen auf (N + C), was in Analogie zur Aussage von Li et al. (2007) eine GABA-antagonistische Wirkung bedingen könnte. Ein eindeutiger Vergleich ist letztendlich jedoch nicht möglich, da die neuen Tacrinderivate keine Tacrin-Homodimere darstellen.

Sowohl mAChR (Abrams et al. 2006) als auch nAChR (Maelicke 2000) besitzen eine wichtige Funktion bei kognitiven Prozessen. Eine Interaktion mit beiden AChR-Haupttypen wurde bereits für Tacrin (Perry et al. 1988) sowie für Tacrinderivate (Elsinghorst et al. 2011) beschrieben und wäre somit ebenfalls bei den neuen Tacrinderivaten denkbar. Im Fall des mAChR wäre u. a. die Bindung an den postsynaptischen M1- sowie an den präsynaptischen M2-Subtyp (Kar 2002) möglich. Dabei könnten die neuen Tacrinderivate - wie für Tacrin postuliert - eine M1-agonistische als auch M2-antagonistische Wirkung (Szilagyi und Lau 1993) besitzen. mAChR weisen 2 Bin-

dungsstellen auf, wodurch neben einer orthosterischen auch eine allosterische Bindung von Liganden ermöglicht wird (Jakubík et al. 2008). Die für Tacrin bekannte allosterische Bindung (Elsinghorst et al. 2007) erfolgt hierbei an einen räumlich von der orthosterischen Bindungsstelle getrennten Bereich (Redka et al. 2008). Dabei bewirkt die Bindung des allosterischen Liganden, dass die Affinität zwischen orthosterischem Liganden und dem Rezeptor durch eine Konformationsänderung des Rezeptors moduliert wird (Gregory et al. 2007). Da die neuen Tacrinderivate im Vergleich zu Tacrin ein höheres MG aufweisen, wäre ihre orthosterische Bindung an den mAChR aufgrund der räumlichen Ausdehnung und der sterischen Verhältnisse eigentlich unwahrscheinlich. Andererseits wäre bei FL16, FL38 und FL98 neben der allosterischen Bindung des Tacrin-Heterozyklus eine zusätzliche orthosterische Bindung des Nitratrestes denkbar.

Eine Verbesserung der Kognition durch M1-Agonisten konnte u. a. an der Ratte (Ragozzino et al. 2012) sowie in klinischen Studien (Bsp. Xanomelin) gezeigt werden (Leonard 2004). Fang et al. (2010) untersuchte die Möglichkeit der dualen Bindung an M1-Rezeptoren. Hierzu wurde Tacrin mit dem M1-Agonisten Xanomelin durch Spacer mit einer Länge von 10-17 Atomen gekoppelt. Der Spacer enthielt wie bei den Tacrinderivaten der vorliegenden Arbeit eine Amin- oder Amidbindung. *In vitro* konnte für die Hybride eine gute Wirksamkeit sowohl bezüglich der AChE-Hemmung, als auch bei ihrer Bindung an den M1-Rezeptor nachgewiesen werden. Bei der gleichzeitigen Gabe der Hybride und dem orthosterischen Liganden ACh wurde die Aktivierung der M1-Rezeptoren jedoch aufgehoben, so dass lediglich eine allosterische Bindung der Hybride vermutet worden war. Die zusätzlich durchgeführten *in vivo*-Untersuchungen an Ratten bestätigten diese Vermutung. Im Fall eines dualen Bindungsmodus wäre die Affinität zum M1-Rezeptor durch die orthosterische Bindung des Xanomelin-Pharmakophors wahrscheinlich erhalten geblieben. Da selbst durch die Kopplung eines hochaffinen M1-Agonisten (Shannon et al. 1994) an den Spacer keine duale Bindung erzielt werden konnte, ist zu vermuten, dass die Bindung der neuen Tacrinderivate an den M1-Rezeptor ebenso nur allosterisch erfolgt. Zu bedenken ist jedoch, dass die Spacer der von Fang et al. (2010) untersuchten Tacrin-Hybride gegenüber den Tacrinderivaten der vorliegenden Arbeit bis zu 3-fach länger waren. Damit liegen bei den neuen Tacrinderivaten vermutlich andere sterische Verhältnisse vor.

Shannon et al. (1990) stellte durch Untersuchungen an der Ratte fest, dass durch Einsatz von M2-Agonisten keine Verbesserung des durch Scopolamin beeinträchtigten Arbeitsgedächtnisses zu erwarten ist. Zudem ist bekannt, dass M2-Rezeptoren über eine nega-

tive Rückkopplung die Freisetzung von ACh regulieren (Lane et al. 2006). Greenlee et al. (2001) konnte bei Untersuchungen an der Ratte nachweisen, dass die orale Applikation von M2-Antagonisten zu einer erhöhten ACh-Konzentration im synaptischen Spalt sowie zur Kognitionsverbesserung bei Ratten führt. Zudem zeigten Svensson et al. (1996) an Cortex-Synaptosomen der Ratte, dass Tacrin eine ACh-Freisetzung bewirken kann. Die Ergebnisse von Greenlee et al. (2001) und Svensson et al. (1996) bestärken somit die Vermutung, dass sowohl Tacrin, als auch die neuen Tacrinderivate durch eine Verminderung der M2-Rezeptor vermittelten Autoinhibition einen ACh-Anstieg im synaptischen Spalt bewirken könnten. Im Gegensatz dazu postulierten Nordberg et al. (1989) eine Tacrin-bedingte verminderte Freisetzung von ACh. Im Cortex von AD-Patienten konnten sie jedoch eine erhöhte ACh-Freisetzung durch Tacrin feststellen. Mishima et al. (2000) untersuchte im Radial Maze u. a. den Einfluss von Scopolamin auf das räumliche Gedächtnis der Ratte. Wie in den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde Scopolamin in einer Dosis von 0,05 mg/100 g KM i. p. appliziert. 30-40 min. nach der Scopolamingabe war neben der zu erwartenden Kognitionseinschränkung ebenfalls eine erhöhte ACh-Freisetzung in mehreren Hirnregionen zu messen. Außerdem konnte durch den M2-Antagonisten AF-DX116 eine vermehrte ACh-Freisetzung erreicht werden. Die Autoren diskutierten diese Beobachtung als Desinhibition des M2-Rezeptors. Außerdem bewirkte AF-DX116 weder durch i. p. noch durch intrazerebrale Applikation eine Beeinträchtigung des räumlichen Gedächtnisses im Radial Maze. Es wurde vermutet, dass vorrangig die Balance zwischen der M1- und der M2-Rezeptorblockade die kognitiven Fähigkeiten der Scopolamin-behandelten Ratte im Radial Maze bestimmt. Dass Tacrinderivate mit dem M2-Rezeptor in Wechselwirkung treten könnten, wurde bereits beschrieben (Elsinghorst et al. 2007) und wäre somit ebenfalls bei den neuen Tacrinderivaten zu vermuten. Dabei deuten die Ergebnisse von Svensson et al. (1996), Mishima et al. (2000) und Greenlee et al. (2001) daraufhin, dass eine Verbesserung der Kognition durch die neuen Tacrinderivate dann begünstigt wäre, wenn sie eine M2-antagonistische Wirkung aufwiesen.

Tränkle et al. (2005) postulierte für den M2-Rezeptor die simultane Bindung von einem orthosterischen (z. B. N-Methyl-Scopolamin) sowie von 2 allosterischen Liganden (2 Tacrinmoleküle) (zitiert in: Wess (2005)). Aufgrund der im Vergleich zu Tacrin stärkeren allosterischen Aktivität des Hexametylen-gekoppelten Tacrin-Homodimers bestand die Vermutung, dass ebenso 2 Tacrinmoleküle gleichzeitig binden können (Tränkle et al. 2005). Bindungs-Simulationen bestätigten, dass sowohl die Bindung von 2 Tacrin-

molekülen gleichzeitig, als auch von einem Molekül des Tacrin-Homodimers an den M2-Rezeptor möglich war. Bei den Tacrin-Heterodimeren FL16, FL38 und FL98 wäre, neben der allosterischen Bindung des Tacrin-Heterozyklus, ebenso eine zweite allosterische Wechselbeziehung des Nitratrestes mit dem M2-Rezeptor denkbar. Tränkle et al. (2005) zeigte zudem, dass ein Abstand der beiden Tacrin-Bindungsstellen von 12 Ångström für die Unterbringung der Hexamethylenkette ausreichend war. Die Tacrin-derivate der vorliegenden Arbeit besitzen Alkylendiamin-Seitenketten von 6 (FL98) bis 9 (FL38) Atomen Länge. Es lässt sich jedoch vermuten, dass die räumliche Ausdehnung des Nitratrestes im Vergleich zu einem zweiten Tacrin-Heterozyklus geringer ist. Somit wäre es möglich, dass auch Spacer mit einer Länge von mehr als 6 Atomen noch kein sterisches Hindernis für die Bindung bedeuten.

Tacrin kann, wie bereits erwähnt, mit dem nAChR in Wechselbeziehung treten. Auch für Tacrinderivate wäre dies denkbar. Dabei besitzt der $\alpha 7$ nAChR insofern einen besonderen Stellenwert, da er sowohl bei kognitiven als auch bei pathophysiologischen Prozessen der AD beteiligt sein soll (siehe 3.3.4).

Dass Tacrinderivate über Wechselbeziehung mit dem NMDA-Rezeptor neuroprotektive Effekte erzielen können, zeigt die Arbeit von Liu et al. (2008). Dies wäre bei den neuen Tacrinderivaten somit ebenfalls zu vermuten. Untersuchungen von Li et al. (1996) und Riekkinen et al. (1999) deuten allerdings daraufhin, dass für die kurzfristige Kognitionsverbesserung eine NMDA-antagonistische Wirkung der neuen Tacrinderivate sogar eher von Nachteil sein könnte. Z. B. stellte Riekkinen et al. (1999) durch Versuche an der Ratte fest, dass eine gleichzeitige i. p. Applikation von Tacrin (0,3 mg/100 g KM) und dem partiellen NMDA-Agonisten D-Cycloserin (1 mg/100 g KM) die Kognition im Maze verbessern konnte. Die alleinige Gabe jeder Substanz blieb hingegen unwirksam. Allerdings war die Kognition hierbei nicht durch Scopolamin, sondern durch die Läsion des hinteren Hippocampus oder des medialen Septums ausgelöst wurden. Li et al. (1996) konnten durch Versuche im 8-armigen Radial Maze an der Ratte zeigen, dass NMDA-Antagonisten (MK801 oder CGS19755) die Scopolamin-induzierte Kognitionseinschränkung verstärken. Ihre alleinige Applikation beeinflusste die Kognition jedoch nicht. Dies könnte darauf hinweisen, dass Scopolamin ebenso mit NMDA-Rezeptorsystemen interagiert (Falsafi et al. 2012). Zudem berichteten Pakpour et al. (2010), dass durch NMDA die Scopolamin-induzierte Verminderung der Kognition begrenzt werden kann.

Wäre die durch FL16, FL38 und FL98 erzielte Kognitionsverbesserung lediglich durch deren Wirkung am NMDA-Rezeptor erklärbar, dann würden die Untersuchungen von Li et al. (1996) und Riekkinen et al. (1999) auf deren NMDA-agonistische Wirkung hindeuten. Sie konnten außerdem zeigen, dass die alleinige Applikation sowohl des NMDA-Agonisten, als auch der NMDA-Antagonisten wirkungslos war. Sollten FL16, FL38 und FL98 eine Kognitionsverbesserung über einen Angriff am NMDA-Rezeptor erzielen, so würde dies wahrscheinlich deren zusätzliche Wechselwirkung mit dem cholinergen System voraussetzen. Die *in vitro*-Daten bezüglich der ChE-Hemmung (siehe Tab. 1) lassen dies vermuten. Die Kognitionsverbesserung der neuen Nitratester könnte somit Resultat einer gleichzeitigen ChE-Hemmung und einer NMDA-Rezeptor vermittelten Wirkung sein.

Es werden weitere pleiotrope Effekte des Tacrins vermutet, die ebenfalls bei den neuen Tacrinderivaten zu erwarten sind. Sie umfassen beispielsweise die Blockierung von Kaliumkanälen, die Hemmung der Monoaminoxidase sowie die Aufnahmehemmung von Serotonin, Dopamin, Noradrenalin und 5-Hydroxytryptophan in die Nervenzelle (Druckarch et al. 1988, Proctor und Harvey 2000). Die Vermutung, dass die neuen Tacrinderivate einige dieser pleiotropen Effekte aufweisen, wird durch Untersuchungen von McKenna et al. (1997) bestärkt. Sie konnten für Tacrinanaloga eine bis zu 400-fach stärkere Serotoninaufnahme-Hemmung gegenüber Tacrin zeigen.

Alle neuen Tacrinderivate zeigen eine mit Tacrin vergleichbare bzw. bessere *in vitro*-Aktivität bei der Hemmung der AChE. Zudem kann man aufgrund der moderaten Lipophilie (log P-Werte) und der weiteren günstigen Voraussetzungen für eine gute Penetration durch die BHS (siehe 7.3) von einer ausreichenden ZNS-Gängigkeit bei allen Tacrinderivaten ausgehen. Eine Verbesserung der Scopolamin-induzierten Kognitionsverminderung konnte jedoch lediglich bei den Nitratestern (FL16, FL38 und FL98) gezeigt werden. Obwohl FL15 und FL99 bei der Hemmung der AChE *in vitro* durchaus mit Tacrin vergleichbare Aktivitäten zeigten, konnten sie keine Kognitionsverbesserung bewirken. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass bei den Substanzen FL16, FL38 und FL98 neben der ChE-Hemmung ebenso pleiotrope Effekte für die Kognitionsverbesserung von Bedeutung zu sein scheinen. Als Beispiel dafür ist die vermutete Wechselwirkung des Nitratrestes mit der peripheral anionic site (PAS) zu nennen (siehe 7.5.3). Des Weiteren ist festzustellen, dass FL16, FL38 und FL98 die Scopolamin-induzierte Kognitionsverminderung in gleichem, jedoch nicht in einem höheren Maß als Tacrin verbessern konnten. Falls durch FL16, FL38 und FL98 eine *in vivo* mit Tacrin

vergleichbare AChE-Hemmung sowie eine zusätzliche kognitionsverbessernde Wirkung der Nitratgruppe zu erwarten wäre, könnte dies somit gleichzeitig für geringe pleiotrope Tacrin-Effekte sprechen. Es wäre z. B. zu erwarten, dass statt der von Tränkle et al. (2005) beschriebenen Bindung von 2 Tacrinmolekülen (s. o.) lediglich ein Molekül von FL16, FL38 oder FL98 allosterisch an den M2-Rezeptor bindet. Sollte der Nitratrest jedoch keine Wechselbeziehung mit der zweiten allosterischen Bindungsstelle eingehen, aber die Bindung eines zweiten Liganden sterisch verhindern, so könnte hierdurch eine geringe Wirkung am M2-Rezeptor erklärt werden.

7.5 NO-Derivate

Obwohl NO eine neurotoxische Wirkung zugeschrieben wird (Law et al. 2001), scheint es jedoch auch neuroprotektive Funktionen zu besitzen (Farinelli et al. 1996). Somit könnten NO-Donatoren bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der AD sinnvolle Therapeutika darstellen (Thatcher et al. 2005).

Zerebrale Minderperfusion wird in Zusammenhang mit der AD diskutiert (Austin et al. 2011), so dass die Nutzung der vasorelaxierenden Wirkung von NO (Jekabsone et al. 2007) einen wichtigen Ansatz bei der Synthese der neuen NO-Tacrin-Hybride darstellte. Da es sich bei FL16, FL38 und FL98 um Nitratester handelt, wäre aufgrund ihrer vermuteten NO-mimetischen Wirkung ebenfalls ein vasorelaxierender Effekt zu erwarten. Darüber hinaus ist NO bei kognitiven Prozessen für die Erhaltung der Hirnfunktion unabdingbar (Thatcher et al. 2005). Zum einen ist NO als Botenstoff im ZNS essentiell (Thatcher et al. 2005). Zum anderen scheint eine gestörte NO-Signalübertragung ebenfalls Teil der AD-Pathogenese zu sein (Steinert et al. 2010).

7.5.1 Wirkung von NO

In Abb. 9 ist dargestellt, dass die alleinige Applikation des NO-Donators (Alkylnitrat) die Scopolamin-induzierte Kognitionsverminderung nicht verbessern konnte. Die NO-mimetische Wirkung der Nitratester (Artz et al. 2001) wäre dennoch insofern bedeutend, da eine zerebrale Minderperfusion sowohl Ursache als auch Folge der AD sein könnte (Austin et al. 2011). Für ersteres sprechen Untersuchungen von Lee et al. (2011), die bei Mäusen durch das Herbeiführen einer chronischen zerebralen Minderperfusion eine mit der AD vergleichbare Kognitionsverminderung zeigen konnten.

Außerdem ist bekannt, dass ein cholinerges Defizit zu einer verminderten NO-Synthese führen kann. Thatcher et al. (2005) erklären dies damit, dass die NO-Synthase durch die Erregung von muscarinergen Rezeptoren aktiviert werden kann. Da Scopolamin ein cholinerges Defizit simuliert, könnte eine geringere NO-Bildung zu einer zerebralen Minderperfusion unter Scopolamin führen. Die in der vorliegenden Arbeit fehlende Wirksamkeit des NO-Donators deutet jedoch daraufhin, dass eine zerebrale Minderperfusion kaum von Bedeutung zu sein scheint.

In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen von Murakami et al. (2000) interessant, die beobachteten, dass die Okklusion beider Arteriae carotides eine verminderte Leistung des Arbeitsgedächtnisses der Ratte im Radial Maze hervorruft. Ab der 5. Woche nach dem Arterienverschluss wurde Tacrin (tgl. 0,03 mg/100 g KM) appliziert, woraufhin eine Kognitionsverbesserung eintrat. Die Autoren diskutierten diese Beobachtung als Folge des Tacrin-bedingten ACh-Anstieges und der somit verstärkten Aktivierung von M1-Rezeptoren. Eine Erhöhung der cholinergen Transmission bewirkte somit trotz eines fehlenden cholinergen Defizites eine Kognitionsverbesserung. Die Ergebnisse von Murakami et al. deuten daraufhin, dass sowohl die zerebrale Minderperfusion als auch ein cholinerges Defizit ähnliche, für die Kognition wichtige Mechanismen auf zellulärer Ebene beeinträchtigen. Z. B. wird eine veränderte Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (engl.: cyclic Guanosinmonophosphat = cGMP) sowohl im Zusammenhang mit NO (Thatcher et al. 2005) als auch mit der Erregung von muscarinergen Rezeptoren (Liu et al. 1997) diskutiert. Zudem zeigten Knox et al. (2011) an der Ratte, dass infolge einer Scopolamin-Behandlung neben der Beeinträchtigung der Kognition, ebenso eine Aktivitätsverminderung der NOS im Gehirn messbar war. Diese Beobachtungen passen zu der Auffassung, dass ACh eine neuromodulatorische Funktion in der sogenannten NO/sGC/cGMP-Signaltransduktionskaskade besitzen könnte (lösliche (engl.: soluble) Guanylatzyklase = sGC) (Smith et al. 2000).

Es konnte u. a. bereits an der Ratte gezeigt werden, dass ein cGMP-Anstieg im Hirngewebe zu einer Verbesserung der Kognition führen kann (Bernabeu et al. 1996). Außerdem lässt sich eine durch Blockade von NMDA-Rezeptoren hervorgerufene Kognitionsverminderung mit Hilfe einer intrazerebralen Applikation von NO-Donatoren, NOS-Substraten oder cGMP-Analoga begrenzen (Smith et al. 2000).

Smith et al. (2000) zeigten die kognitionsverbessernde Wirkung des Nitratesters GT 715 an der Scopolamin-vorbehandelten Ratte im MWM. Dabei konnte sowohl eine zeit- als auch dosisabhängige Kognitionsverbesserung nachgewiesen werden. Scopolamin

(0,114 $\mu\text{mol}/100\text{ g KM i. p.}$) wurde jeweils 25 min. vor Versuchsbeginn appliziert, was der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Dosis entspricht. Im Gegensatz zu dem NO-Donator (Alkylnitrat) der vorliegenden Arbeit konnte durch GT 715 eine Kognitionsverbesserung erzielt werden. Zur näheren Charakterisierung der GT 715-Wirkung wurde Tacrin (6 $\mu\text{mol}/100\text{ g KM i. p.}$) untersucht. Dabei war kein signifikanter Unterschied zwischen der GT 715-Gruppe und der Tacrin-Gruppe nachweisbar. Smith et al. (2000) hielten den Einfluss von GT 715 auf die zerebrale Durchblutung für unwahrscheinlich, da GT 715 *in vitro* nur einen geringen vasorelaxierenden Effekt hervorrief. Da NO die sGC aktiviert und somit zu einem Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration führt (Thatcher et al. 2005), unterstreicht die Beobachtung von Smith et al. die mögliche Bedeutung der NO/sGC/cGMP-Signaltransduktionskaskade bei kognitiven Prozessen. Dabei kann cGMP auch die pro-inflammatorische Wirkung von A β vermindern (Paris et al. 1999). Da der Nitratester Glyceroltrinitrat (GTN) die Aktivierung der sGC/cGMP-Kaskade jedoch auch in Abwesenheit des Zwischenproduktes NO bewirken kann (Kleschyov et al. 2003), lässt sich dies ebenso für den NO-Donator der vorliegenden Arbeit vermuten.

7.5.2 FL99 + NO-Donator

Den Abb. 8 und 10 ist zu entnehmen, dass FL99 sowohl bei alleiniger, als auch bei gemeinsamer Applikation mit dem NO-Donator keine Kognitionsverbesserung bewirken konnte. D.h., obwohl Tacrin und FL99 *in vitro* ähnlich stark die ChE hemmen, wirkt *in vivo* lediglich Tacrin. Dass FL38, der analoge Nitratester von FL99 *in vivo* ebenfalls wirksam war, spricht für die entscheidende Bedeutung der Kopplung des Nitratrestes mit der Alkylendiamin-Seitenkette (siehe 7.5.3). Es ist zu vermuten, dass durch die bloße Kopplung der Alkylendiamin-Seitenkette mit dem Tacrin-Heterozyklus zwar die ChE-Hemmung *in vitro* erhalten bleibt, die pleiotropen, kognitionsverbessernden Wirkungen des Tacrins jedoch offensichtlich vermindert werden (siehe 7.4). FL99 zeigt gegenüber Tacrin *in vitro* eine geringfügig höhere Selektivität bei der Hemmung der AChE. Dies könnte durch eine, wie bereits bei Alkylketten beobachtete (Pomponi et al. 1997), Wechselwirkung der Alkylendiamin-Seitenkette mit aromatischen Aminosäuren der ChE erklärt werden. Der geringe Unterschied der Selektivität zwischen FL99 und Tacrin erklärt jedoch nicht die fehlende Wirksamkeit von FL99.

Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen von Capone et al. (1999). Sie untersuchten in einer Shuttle-Box den Einfluss eines Tacrinderivates (N-octyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-9-aminoacridin = THA-C8) auf das Vermeidungsverhalten der Maus. THA-C8 und FL99 besitzen nahezu das gleiche MG (~ 310 g/Mol) und weisen eine vergleichbare Struktur auf. Im Unterschied zu FL99 wurde bei THA-C8 jedoch statt einer Alkylendiamin- eine Alkyl-Kette mit einer Länge von 8 C-Atomen an den Tacrin-Heterozyklus gekoppelt. THA-C8 (0,02-0,2 mg/100 g KM) konnte die Kognition im Gegensatz zu FL99 signifikant verbessern. Es ist jedoch zu bemerken, dass Capone et al., im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, keine Kognitionseinschränkung der Tiere herbeigeführt hatten. Des Weiteren wurde von Capone et al. gezeigt, dass THA-C8 in einer Dosis von 0,3 mg/100 g KM, welche somit noch unterhalb der FL99-Dosis (0,5 mg/100 g KM) liegt, bereits die Bewegung der Tiere in der Shuttle-Box beeinträchtigte.

7.5.3 NO-Tacrinderivate

Abb. 12 ist zu entnehmen, dass alle NO-Tacrin-Hybride der vorliegenden Arbeit die Scopolaminwirkung antagonisieren konnten. Betrachtet man dies in Zusammenhang mit Ergebnissen vorangegangener Versuche am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena, so ist festzustellen, dass FL16, FL38 und FL98 eine mit Tacrin vergleichbare Wirkung besitzen. Die *in vitro* ermittelte ChE-Hemmung durch FL16, FL38 und FL98 liegen etwa in der Größenordnung des Tacrins (siehe Tab. 1).

Da es sich bei den neu synthetisierten Tacrinderivaten FL16, FL38 und FL98 um Nitatester handelt, war von ihnen eine vasodilatierende Wirkung zu erwarten. Bei FL16 und FL38 konnte dies mit Hilfe von *in vitro*-Untersuchungen an Pulmonalarterien des Schweines bestätigt werden. (für die Überlassung der Befunde danke ich Frau Dr. C. Roegler, Institut für Pharmazie der FSU Jena). Bei FL98 war aufgrund der mit FL16 und FL38 vergleichbaren Molekülstruktur ebenso von einer vasodilatierenden Wirkung auszugehen. Da zerebrale Minderperfusion (siehe 3.2.2) eine Kognitionsverminderung bewirkt (Lee et al. 2011) und ebenso in Zusammenhang mit der AD diskutiert wird (Austin et al. 2011), wäre die vasodilatierende Wirkung von FL16, FL38 und FL98 eine mögliche Erklärung für deren Kognitionsverbesserung. Andererseits konnte durch den NO-Donator selbst (siehe 7.5.1) keine Kognitionsverbesserung erzielt werden, was die Interpretation der Wirkung von FL16, FL38 und FL98 erschwert.

Obwohl ein cholinerges Defizit zu einer verminderten NO-Bildung führen kann (Thatcher et al. 2005) und damit die zerebrale Durchblutung beeinflussen würde, ist dies möglicherweise ein protrahiert einsetzender Effekt, welcher durch die einmalige Scopolamin-Applikation nicht simuliert werden kann. Auch Wang et al. (2010b) und Lee et al. (2011) postulieren eine chronische zerebrale Minderperfusion als eine der Ursachen der AD. Dies lässt die Möglichkeit offen, dass FL16, FL38 und FL98 evtl. nach langfristiger Applikation bei an AD erkrankten Patienten eine Kognitionsverbesserung bewirken könnten.

Für die Annahme, dass die neuen NO-Tacrin-Hybride gleichzeitig mehrere Angriffspunkte (engl.: Multi-Target-Directed Ligands = MTDL) (Tumiatti et al. 2010) besitzen könnten, sprechen Beobachtungen von Abdul-Hay et al. (2009). Sie untersuchten an der Ratte das NO-Derivat HCT-1026, bei dem statt Tacrin das NSAR Flurbiprofen mit einem NO-haltigen Pharmakophor gekoppelt worden war. Dabei konnte HCT-1026 die Scopolamin-bedingte Kognitionsverminderung der Ratte verbessern, während die von Flurbiprofen bekannte Amyloid-vermindernde Wirkung erhalten blieb. Die Autoren vermuteten hierbei die NO-Bereitstellung eines HCT-126 Metaboliten und verweisen auf die Bedeutung der NO/sGC/cGMP-Kaskade bei kognitiven Prozessen. Obwohl die ChE-Hemmwirkung des Tacrins bei den neuen NO-Tacrinderivaten erhalten blieb (siehe Tab. 1), wäre somit eine weitere kognitionsverbessernde Wirkung aufgrund einer möglichen Beteiligung ihrer Metabolite an der NO/sGC/cGMP-Kaskade zu vermuten. Obwohl die AChE im Vergleich zur BuChE weitaus weniger Raum für die Substratbindung bietet (Saxena et al. 2003), scheint kein sterisches Hindernis bei der Wechselwirkung zwischen AChE und den im Vergleich zu Tacrin größeren Molekülen von FL16, FL38 und FL98 vorzuliegen. Dies lässt vermuten, dass alle 3 Substanzen innerhalb der 20 Å tiefen gorge (engl.: Tasche) (Berg et al. 2011) ausreichend stabilisiert werden. Es wäre möglich, dass die NO-Tacrin-Hybride, wie bereits bei kleineren Molekülen (z. B. ACh) beschrieben wurde, im Bereich der PAS gebunden werden und mit aromatischen Aminosäuren innerhalb der gorge in Wechselwirkung treten (Berg et al. 2011). Somit könnten die Substanzen über mehrere gering affine Bereiche zum aktiven Zentrum geleitet („aromatic guidance“, engl.: „aromatische Führung“) werden (Sussman et al. 1991). Dabei wäre vorstellbar, dass der Tacrin-Heterozyklus von FL16, FL38 und FL98, wie für Tacrin bekannt (Proctor und Harvey 2000), mit dem aktiven Zentrum der AChE in Wechselwirkung tritt. Dieser Bindungsmodus wurde bereits bei weiteren Tacrin-Hybriden postuliert (Carlier et al. 1999) und lässt dies somit ebenfalls bei den neu-

en Tacrinderivaten vermuten. Außerdem könnte durch die Alkylendiamin-Seitenkette eine zusätzliche Wechselwirkung zwischen dem Nitratrest und der sich am Eingang der gorge befindenden PAS (Pohanka 2011) ermöglicht werden. Dies wurde bereits bei Alkylen-gekoppelten Tacrin-Hybriden beschrieben, wobei eine Spacerlänge von 7 C-Atomen optimal zu sein scheint (Savini et al. 2001). FL38 weist bei einer Spacerlänge von 8 (7C+1N) Atomen die geringste $IC_{50_{AChE}}$ der neu synthetisierten Tacrinderivate auf. Dies könnte u. a. durch eine, im Vergleich zu anderen PAS-Liganden (z. B. Phenylring; Pang et al. 1996), geringere räumliche Ausdehnung des Nitratrestes erklärt werden, so dass ein längerer Spacer möglich wäre. Die Stabilisierung im Bereich der PAS, z. B. durch eine π - π -Beziehung, wurde bereits bei anderen PAS-Liganden beschrieben (Saxena et al. 2003) und wäre somit ebenfalls beim Nitratrest denkbar. Da dieser über eine Doppelbindung verfügt, könnte beispielsweise eine π - π Wechselwirkung mit den aromatischen Aminosäuren der PAS entstehen.

Obwohl FL16, FL38 und FL98 unterschiedliche Spacerlängen aufweisen, liegen ihre $IC_{50_{AChE}}$ in etwa der gleichen Größenordnung. Zudem unterscheiden sie sich kaum von der des Tacrins. Dies könnte dafür sprechen, dass im Bereich der PAS nur eine vergleichsweise geringe Stabilisierung des Nitratrestes vorzuliegen scheint. Dennoch wäre eine Art „Abschirmung“ der PAS durch den Nitratrest vorstellbar, wodurch bestimmte PAS-abhängige Prozesse beeinflusst werden könnten. Diese würden somit die allosterische Modulation des aktiven Zentrums (Johnson und Moore 2006), die Substratinhibition (Lane et al. 2006) und die Amyloidbildung (Pohanka 2011) betreffen.

Eine Stabilisierung der Alkylendiamin-Seitenkette durch hydrophobe Wechselwirkungen mit aromatischen Aminosäuren innerhalb der gorge wäre zu erwarten. Zudem könnten zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen zwischen C-Atomen des Spacers und der PAS zur Stabilisierung der neuen NO-Tacrin-Hybride beitragen. Andererseits wäre der Spacer ebenso als sterisches Hindernis vorstellbar, was bereits von Pang et al. (1996) bei einem Alkylen-gekoppeltem Tacrin-Benzyl-Hybrid vermutet worden war. Eine zusätzliche Stabilisierung durch ein protonierbares Stickstoff-Atom, welches sich innerhalb des Spacers befindet, wurde von Gemma et al. (2006) bei Hyperzin A-Tacrin-Hybriden beschrieben und wäre somit ebenfalls bei allen neuen NO-Tacrin-Hybriden denkbar. Shao et al. (2004) postulierten, dass eine H^+ -Brückenbildung zwischen der Amid-Gruppe von Tacrin-Hybriden mit Aminosäuren der gorge möglich ist, so dass dies ebenfalls bei dem Amid FL16 anzunehmen wäre. Eine H^+ -Brückenbildung könnte jedoch auch zur Stabilisierung der Amine FL38 und FL98 beitragen. Zudem wäre die

Anlagerung von Protonen, welche aus Aminosäuren der gorge stammen, an das protonierbare N-Atom vorstellbar.

Andererseits wäre es auch möglich, dass das N-Atom nach seiner Protonierung eine Kationen- π Beziehung eingehen könnte (Shao et al. 2004). Da das Amid FL16 *in vitro* eine etwas höhere $IC_{50_{AChE}}$ als die Amine FL38 und FL98 aufweist, scheint die Amid-Gruppe für die ChE-Hemmwirkung eher nachteilig zu sein. Außerdem konnte FL38 im Gegensatz zu FL16 die Gesamtfehleranzahl außer nach 20, auch nach 60 min. reduzieren, was ebenso die bessere Wirksamkeit der Amine im Vergleich zu Amiden *in vivo* bestätigen würde. Dass jedoch das andere Amin (FL98) die Gesamtfehleranzahl ebenso nur nach 20 min. reduzieren konnte, spricht hingegen für eine vergleichbare Wirksamkeit der Amine und Amide *in vivo*.

7.6 Tacrin-Ferulasäure-Hybrid FL15

Das Tacrin-Ferulasäure-Hybrid FL15 konnte die Scopolaminwirkung nicht antagonisieren (siehe Abb. 13). FL15 zeigte jedoch *in vitro* eine ähnliche ChE-Hemmwirkung wie Tacrin, so dass dessen fehlende Wirksamkeit *in vivo* eigentlich nicht zu erwarten gewesen wäre. Eine nahezu gleiche Beobachtung machten Fleck et al. (2010). Sie untersuchten an der Ratte die kognitionsverbessernde Wirkung von zwei weiteren Tacrin-Ferulasäure-Hybriden im Radial Maze. Dabei ergaben die *in vitro*-Messungen ebenso mit Tacrin vergleichbare oder eine stärker ausgeprägte ChE-Hemmung. *In vivo* konnte jedoch, ähnlich wie bei FL15, keine Verbesserung der Scopolamin-induzierten Kognitionsverminderung bestätigt werden.

Im Gegensatz dazu konnten Pi et al. (2012) an der Maus für das Tacrin-Ferulasäure-Hybrid T6FA eine Kognitionsverbesserung im MWM zeigen. Sie führten die Kognitionseinschränkung jedoch nicht durch Scopolamin, sondern durch intrazerebrale Applikation von A β herbei. Außerdem wurde T6FA über einen 3-wöchigen Zeitraum oral appliziert. Die *in vitro*-Messungen ergaben, dass T6FA sowohl in der Lage war, die AChE zu hemmen, als auch die A β -Ablagerung zu vermindern. Pi et al. (2012) vermuteten, dass T6FA sowohl im Bereich des katalytischen Zentrums als auch an der PAS der AChE bindet. Daher wurde eine Antagonisierung der AChE-induzierten A β -Aggregation (Galdeano et al. 2010) vermutet. Für FL15 wäre anzunehmen, dass der 4-Hydroxy-3-Methoxy-Phenyl-Ring ebenso mit der PAS in Wechselwirkung tritt, und dadurch, ähnlich wie T6FA, die AChE induzierte A β -Aggregation verhindern könnte.

Dies könnte trotz der ausbleibenden Antagonisierung des vergleichsweise kurzfristigen Scopolamineffekts geschehen. Der im Gegensatz zu T6FA (11 Atome) etwas kürzere Spacer von FL15 (8 Atome) wäre für eine duale Bindung mit der AChE möglicherweise nicht optimal. Dafür sprechen ebenso Beobachtungen von Elsinghorst et al. (2006). Sie konnten zeigen, dass bei Hydrazid-gekoppelten Tacrin-Trimethoxybenzen-Hybriden, die eine mit FL15 vergleichbare Molekülstruktur aufweisen, eine Spacerlänge von 11-12 Atomen die Hemmung der AChE begünstigt.

Boultadakis et al. (2010) untersuchten das Ferulasäure-NO-Hybrid NCX 2057 hinsichtlich seiner Wirkung auf das Wiedererkennungsgedächtnis der Ratte. Interessanterweise wurden hierbei zwei Pharmakophore hybridisiert, die auch Teilstrukturen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tacrinderivate darstellen (Ferulasäure: FL15; NO: FL16, FL38 und FL98). NCX 2057 konnte die Scopolamin-induzierte Kognitionsverminderung antagonisieren. Boultadakis et al. vermuteten eine modulatorische Funktion von NCX 2057 im Zusammenspiel von cholinergem- und nitrerem System. Außerdem konnten sie zeigen, dass die alleinige Applikation von Ferulasäure keine Kognitionsverbesserung bewirken konnte.

Chen et al. (2012) untersuchte Tri-Hybride, bei denen Ferulasäure gleichzeitig mit Tacrin und einem NO-Donator gekoppelt worden waren. Alle von Chen et al. synthetisierten Substanzen zeigten bei der Hemmung der ChE *in vitro* eine höhere Aktivität als Tacrin. Weiterhin waren die Tri-Hybride *in vivo* hinsichtlich ihrer Wirkung an der Scopolamin-vorbehandelten Maus untersucht worden. Bemerkenswert war dabei, dass ein bestimmtes Tri-Hybrid die Scopolamin-induzierte Kognitionseinschränkung besser antagonisieren konnte als sein Analogon, welches keine Nitratgruppe enthielt. Diese Beobachtung spricht dafür, dass weniger der Ferulasäurerest, als die Nitratgruppe für eine kurzfristige Wirksamkeit *in vivo* verantwortlich gewesen zu sein scheint.

Die Ergebnisse von Chen et al. (2012) und Fleck et al. (2010) deuten daraufhin, dass die Hybridisierung von Ferulasäure und Tacrin zum Erzielen einer kurzfristigen Kognitionsverbesserung kaum geeignet ist. Dass FL15 *in vivo* nicht wirksam war, unterstreicht diese Vermutung. Das von Boultadakis et al. (2010) untersuchte NO-Ferulasäure-Hybrid NCX 2057 konnte die Scopolaminwirkung zwar antagonisieren, jedoch scheint dafür hauptsächlich dessen Funktion als NO-Donator bedeutsam zu sein. Die Beobachtungen von Pi et al. (2012) weisen hingegen darauf hin, dass Ferulasäure-Tacrin-Hybride nach subchronischer Gabe zu einer Kognitionsverbesserung führen können,

was ebenfalls für FL15 zutreffen könnte. Die für Ferulasäure bekannte, hepatoprotektive Wirkung (Rukkumani et al. 2004) könnte dabei erhalten bleiben.

7.7 Hepatotoxizität von FL16 und FL38

FL16 und FL38 scheinen Leberfunktionsparameter im Gegensatz zu Tacrin kaum zu beeinflussen (siehe Tab. 2). Dafür sprechen ebenso die histologischen Untersuchungen der Rattenleber (für die Überlassung der Befunde danke ich Frau PD Dr. med. A. Lupp, Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Klinikums der FSU Jena). Tacrin führte zu perizentralen Nekrosen, einer fettigen Degeneration und einem vollständigen Verlust des Leberglykogens. Im Gegensatz dazu wurden, außer einem verminderten Glykogengehalt nach FL38-Gabe, keine wesentlichen morphologischen Veränderungen durch FL16 und FL38 hervorgerufen.

Sowohl NO (Pae et al. 2000) als auch NO-Donatoren (Fiorucci et al. 2004) besitzen eine hepatoprotektive Wirkung, die auch durch die neuen Nitratester hervorgerufen werden könnte. Z. B. untersuchten Futter et al. (2001) die Wirkung eines Paracetamol-NO-Hybrids an der Ratte. Dabei beobachteten sie, dass durch die Hybridisierung von Paracetamol mit NO ein Serum-Transaminasenanstieg verhindert werden konnte. Dies könnte beispielsweise durch die antiinflammatorische (Granger und Kubes 1996), antioxidative (Thatcher et al. 2005) und antiapoptotische Wirkung (Fiorucci et al. 2004) von NO begründet werden.

Es ist nicht auszuschließen, dass die hepatotoxische Wirkung des Tacrins, welche u. a. durch die Bildung von ROS vermittelt wird (Osseni et al. 1999), trotz dessen Derivatisierung erhalten bleibt. Jedoch postulieren Svegliati-Baroni et al. (2001), dass ROS durch NO abgefangen werden können. Sollten FL16 und FL38 in der Lage sein, NO freizusetzen, könnte dies die hepatotoxische Wirkung von Tacrin reduzieren.

Weiterhin ließe sich die hepatoprotektive Wirkung von FL16 und FL38 durch eine im Vergleich zu Tacrin, veränderte Metabolisierung erklären. Tacrin wird v. a. am CYP P450 1A2 hydroxyliert (Madden et al. 1993). Hydroxylierte Tacrinmetabolite werden für die Hepatotoxizität verantwortlich gemacht (Larsen et al. 1999). Es wäre möglich, dass die neuen NO-Tacrin-Hybride nicht durch CYP 1A2 metabolisiert werden, wodurch die Bildung von toxischen Metaboliten vermindert würde. Außerdem wurde gezeigt, dass die Inhibierung von CYP 1A2 die toxische Tacrinwirkung reduzieren kann

(Meng et al. 2007). Sollten die neuen NO-Tacrin-Hybride selbst als Inhibitoren des CYP 1A2 wirksam sein, so könnte dies ebenso deren Hepatoprotektion erklären.

8. Schlussfolgerungen

- Alle neu synthetisierten Tacrinderivate wiesen *in vitro* eine ChE-Hemmung auf, die in der Größenordnung von Tacrin lag. Eine mit Tacrin vergleichbare, kognitionsverbessernde Wirkung erzielten dabei jedoch nur die NO-Tacrin-Hybride (FL16, FL38 und FL98), wobei kein wesentlicher Unterschied zwischen Amid- und Amingekoppelten NO-Tacrin-Hybriden festzustellen war.
- Da die kombinierte Gabe von FL99 und dem NO-Donator im Gegensatz zu FL38, dem analogen Nitratester von FL99, *in vivo* nicht wirksam war, schien die Kopplung des Nitratrestes mit der Alkylendiamin-Seitenkette entscheidend für die Wirksamkeit der neuen Tacrinderivate *in vivo* zu sein.
- Es konnte weder durch die bloße Kopplung der Alkylendiamin-Seitenkette mit dem Tacrinrest (FL99) noch durch Hybridisierung von Tacrin und Ferulasäure (FL15) eine Kognitionsverbesserung *in vivo* erreicht werden.
- Die Hepatotoxizität von Tacrin trat bei Gabe der beiden NO-Tacrin-Hybride FL16 und FL38 nicht auf.
- Zusätzliche kognitionsverbessernde Wirkungen wären von den neuen NO-Tacrin-Hybriden einerseits durch ihren vasodilatierenden Effekt, zum anderen durch eine mögliche Wechselwirkung zwischen dem Nitratrest und der PAS der AChE zu erwarten. Somit könnte neben einer Erhöhung des zerebralen Blutflusses gleichzeitig die ChE-bedingte Amyloidbildung vermindert werden.
- Durch drei der fünf neu synthetisierten Tacrinderivate konnte die nach Scopolamin eingeschränkte Kognition der Ratte verbessert werden. Dabei kommt insbesondere den beiden NO-Tacrinderivaten FL16 und FL38 aufgrund ihrer mit Tacrin vergleichbaren kognitionsverbessernden Wirkung und fehlender Hepatotoxizität besondere Bedeutung zu als Leitstrukturen für neue Alzheimer-Medikamente.
- Wegen ihrer zusätzlich zu vermutenden, protrahierten kognitionsverbessernden Wirkung könnten sie auch als MTDL wirksam sein. Für eine endgültige Bewertung der Substanzen wären ergänzende Untersuchungen (histologische Analysen des Hirngewebes, Rezeptorbindungsstudien, functional imaging, Testung an AD-Knockout-Tieren) erforderlich, um einen Einsatz zur Behandlung von AD-Patienten zu begründen.

9. Literaturverzeichnis

Abdul-Hay SO, Luo J, Ashghodom RT, Thatcher GR. 2009. NO-flurbiprofen reduces amyloid-beta, is neuroprotective in cell culture, and enhances cognition in response to cholinergic blockade. *J Neurochem.*, 111: 766-776.

Abrams P, Andersson KE, Buccafusco JJ, Chapple C, de Groat WC, Fryer AD, Kay G, Laties A, Nathanson NM, Pasricha PJ, Wein AJ. 2006. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol.*, 148: 565-578.

Alva G, Cummings JL. 2008. Relative tolerability of Alzheimer's disease treatments. *Psychiatry (Edgmont)*, 5: 27-36.

Appel J, Potter E, Shen Q, Pantol G, Greig MT, Loewenstein D, Duara R. 2009. A comparative analysis of structural brain MRI in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Behav Neurol.*, 21: 13-19.

Artz JD, Toader V, Zavorin SI, Bennett BM, Thatcher GR. 2001. In vitro activation of soluble guanylyl cyclase and nitric oxide release: a comparison of NO donors and NO mimetics. *Biochemistry*, 40: 9256-9264.

Astles PC, Baker SR, Boot JR, Broad LM, Dell CP, Keenan M. 2002. Recent progress in the development of subtype selective nicotinic acetylcholine receptor ligands. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.*, 1: 337-348.

Austin BP, Nair VA, Meier TB, Xu G, Rowley HA, Carlsson CM, Johnson SC, Prabhakaran V. 2011. Effects of hypoperfusion in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*, 26 (Suppl 3): 123-133.

Barranco-Quintana JL, Allam MF, Del Castillo AS, Navajas RF. 2005. Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol.*, 40: 613-618.

Battistin L, Cagnin A. 2010. Vascular cognitive disorder. A biological and clinical overview. *Neurochem Res.*, 35: 1933-1938.

Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. 2010. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.*, 23: 213-227.

Bencherif M, Lipiello PM. 2010. Alpha7 neuronal nicotinic receptors: the missing link to understanding Alzheimer's etiopathology? *Med Hypotheses*, 74: 281-285.

Berg L, Andersson CD, Artursson E, Hörnberg A, Tunemalm AK, Linusson A, Ekström F. 2011. Targeting acetylcholinesterase: identification of chemical leads by high throughput screening, structure determination and molecular modeling. *PLoS One*, 6: e26039.

Bernabeu R, Schmitz P, Faillace MP, Izquierdo I, Medina JH. 1996. Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport*, 7: 585-588.

Biessels GJ, Kappelle LJ, Utrecht Diabetic Encephalopathy Study Group. 2005. Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology. *Biochem Soc Trans.*, 33: 1041-1044.

Bird TD. Alzheimer Disease Overview. 2010. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews [Internet]*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-1998 Oct 23 [updated 2010 Mar 30].

Birks J. 2006. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2006 Jan 25; (1): CD005593.

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. 2006. Alzheimer's disease. *Lancet*, 368: 387-403.

Boultadakis A, Liakos P, Pitsikas N. 2010. The nitric oxide-releasing derivative of ferulic acid NCX 2057 antagonized delay-dependent and scopolamine-induced performance deficits in a recognition memory task in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34: 5-9.

Breitner JC, Haneuse SJ, Walker R, Dublin S, Crane PK, Gray SL, Larson EB. 2009. Risk of dementia and AD with prior exposure to NSAIDs in elderly community-based cohort. *Neurol.*, 72: 1899-1905.

Buccafusco JJ. 2004. The cholinergic hypothesis - past and present. In: *Cognitive Enhancing Drugs*. Hrsg.: Buccafusco JJ, Birkäuser, Schweiz, 1-10.

Buchwald P, Bodor N. 1998. Octanol-water partition: searching for predictive models. *Curr Med Chem.*, 5: 353-380.

Budimir A. 2011. Metal ions, Alzheimer's disease and chelation therapy. *Acta Pharm.*, 61: 1-14.

Butler D, Bendiske J, Michaelis ML, Karanian DA, Bahr BA. 2007. Microtubule-stabilizing agent prevents protein accumulation-induced loss of synaptic markers. *Eur J Pharmacol.*, 562: 20-27.

Butterfield DA. 2002. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res.*, 36: 1307-1313.

Candore G, Balistreri CR, Grimaldi MP, Listi F, Chiapelli F, Lio D, Caruso C. 2006. Age-related inflammatory diseases: role of genetics and gender in the pathology of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.*, 1089: 472-86.

Capone F, Oliverio A, Pomponi M, Marta M, Gatta F, Pavone F. 1999. Effects of the novel acetylcholinesterase inhibitor N-octyl-1,2,3, 4-tetrahydro-9-

aminoacridine on locomotor activity and avoidance learning in mice. *Neurobiol Learn Mem.*, 71: 301-307.

Carlier PR, Chow ES, Han Y, Liu J, El Yazal J, Pang YP. 1999. Heterodimeric tacrine-based acetylcholinesterase inhibitors: investigating ligand-peripheral site interactions. *J Med Chem.*, 42: 4225-4231.

Carter MD, Simms GA, Weaver DF. 2010. The development of new therapeutics for Alzheimer's disease. *Clin Pharmacol Ther.*, 88: 475-486.

Castellani RJ, Smith MA. 2011. Compounding artefacts with uncertainty, and an amyloid cascade hypothesis that is 'to big to fail'. *J Pathol.*, 224: 147-152.

Cataldo JK, Prochaska JJ, Glantz SA. 2010. Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's Disease: an analysis controlling for tobacco industry affiliation. *J Alzheimers Dis.*, 19: 465-489.

Chen Y, Sun J, Fang L, Liu M, Peng S, Liao H, Lehmann J, Zhang Y. 2012. Tacrine-Ferulic Acid-Nitric Oxide (NO) Donor Trihybrids as Potent, Multifunctional Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibitors. *J Med Chem.*, 55: 4309-4321.

Chopra K, Misra S, Kuhad A. 2011. Neurobiological aspects of Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets*, 15: 535-555.

Christensen DD. 2007. Alzheimer's disease: progress in the development of anti-amyloid disease-modifying therapies. *CNS Spectr.*, 12: 113-116.

Churcher I. 2006. Tau therapeutic strategies for the Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem.*, 6: 579-595.

Coleman PD, Yao PJ. 2003. Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 24: 1023-1027.

Dhillon S. 2011. Rivastigmine transdermal patch: a review of its use in the management of dementia of Alzheimer's type. *Drugs*, 71: 1209-1231.

Drachman DA. 2006. Aging of the brain, entropy, and Alzheimer disease. *Neurol.*, 67: 1340-1352.

Drukarch B, Leysen JE, Stoof JC. 1988. Further analysis of the neuropharmacological profile of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA), an alleged drug for the treatment of Alzheimer's disease. *Life Sci.*, 42: 1011-1017.

Dubreuil D, Tixier C, Dutrieux G, Edeline JM. 2003. Does the radial arm maze necessarily test spatial memory? *Neurobiol Learn Mem.*, 79: 109-117.

Dudchenko PA. 2004. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev.*, 28: 699-709.

Ebert U, Siepmann M, Oertel R, Wesnes KA, Kirch W. 1998. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of scopolamine after subcutaneous administration. *J Clin Pharmacol.*, 38: 720-726.

Eglen RM. 2006. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol.*, 26: 219-233.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.*, 7: 88-95.

Elsinghorst PW, Tanarro CM, Gütschow M. 2006. Novel heterobivalent tacrine derivatives as cholinesterase inhibitors with notable selectivity toward butyrylcholinesterase. *J Med Chem.*, 49: 7540-7544.

Elsinghorst PW, Cieslik JS, Mohr K, Tränkle C, Gütschow M. 2007. First galamine-tacrine hybrid: design and characterization at cholinesterases and the M2 muscarinic receptor. *J Med Chem.*, 50: 5685-5695.

Elsinghorst PW, Härtig W, Gündisch D, Mohr K, Tränkle C, Gütschow M. 2011. A hydrazide linker strategy for heterobivalent compounds as ortho- and allosteric ligands of acetylcholine-binding proteins. *Curr Top Med Chem.*, 11: 2731-2748.

Eschweiler GW, Leyhe T, Klöppel S, Hüll M. 2010. New developments in the diagnosis of dementia. *Dtsch Ärztebl Int.*, 107: 677-683.

Falsafi SK, Deli A, Höger H, Pollak A, Lubec G. 2012. Scopolamine administration modulates muscarinic, nicotinic and NMDA receptor systems. *PLoS One*, 7: e32082.

Fang L, Appenroth D, Decker M, Kiehnopf M, Roegler C, Deufel T, Fleck C, Peng S, Zhang Y, Lehmann J. 2008 Synthesis and biological evaluation of NO-donor-tacrine hybrids as hepatoprotective anti-Alzheimer drug candidates. *J Med Chem.*, 51: 713-716.

Fang L, Jumpertz S, Zhang Y, Appenroth D, Fleck C, Mohr K, Tränkle C, Decker M. 2010. Hybrid molecules from xanomeline and tacrine: enhanced tacrine actions on cholinesterases and muscarinic M1 receptors. *J Med Chem.*, 53: 2094-2103.

Farinelli SE, Park DS, Greene LA. 1996. Nitric oxide delays the death of trophic factor-deprived PC12 cells and sympathetic neurons by a cGMP-mediated mechanism. *J Neurosci.*, 16: 2325-2334.

Feher M, Sourial E, Schmidt JM. 2000. A simple model for the prediction of blood-brain partitioning. *Int J Pharm.*, 201: 239-247.

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczuzfca M. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366: 2112-2117.

Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Mencarelli A, Farneti S, Del Soldato P, Morelli A. 2004. Liver delivery of NO by NCX-1000 protects against acute liver failure and mitochondrial dysfunction induced by APAP in mice. *Br J Pharmacol.*, 143: 33-42.

Fisher A. 2008. Cholinergic treatments with emphasis on m1 muscarinic agonists as potential disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics.*, 5: 433-442.

Fleck C, Appenroth D, Fang L, Schott Y, Lehmann J, Decker M. 2010. Investigation into the in vivo effects of five novel tacrine/ferulic acid and beta-carboline derivatives on scopolamine-induced cognitive impairment in rats using radial maze paradigm. *Drug Res/Arzneim Forsch.*, 60: 299-306.

Forette F, Hauw JJ. 2010. [Treatment of Alzheimer's disease and future approaches]. *Therapie*, 65: 429-437.

Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66: 137-147.

Frey KA, Koeppe RA, Mulholland GK, Jewett D, Hichwa R, Ehrenkaufer RL, Carey JE, Wieland DM, Kuhl DE, Agranoff BW. 1992. In vivo muscarinic cholinergic receptor imaging in human brain with [11C]scopolamine and positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 12: 147-154.

Futter LE, al-Swayeh OA, Moore PK. 2001. A comparison of the effect of nitroparacetamol and paracetamol on liver injury. *Br J Pharmacol.*, 132: 10-12.

Gahring LC, Rogers SW. 2006. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *AAPS J.*, 7: E885-E894.

Galdeano C, Viayna E, Arroyo P, Bidon-Chanal A, Blas JR, Muñoz-Torrero D, Luque FJ. 2010. Structural determinants of the multifunctional profile of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors as anti-Alzheimer agents. *Curr Pharm Des.*, 16: 2818-2836.

Galimberti D, Scarpini E. 2011. Disease-modifying treatments for Alzheimer's disease. *Ther Adv Neurol Disord.*, 4: 203-216.

Gandy S. 2005. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. 2005. *J Clin Invest.*, 115: 1121-1129.

García AM, Ramón-Bou N, Porta M. 2010. Isolated and joint effects of tobacco and alcohol consumption on risk of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*, 20: 577-586.

Geller LN, Potter H. 1999. Chromosome missegregation and trisomy 21 mosaicism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.*, 6: 167-179.

Gemma S, Gabellieri E, Huleatt P, Fattorusso C, Borriello M, Catalanotti B, Butini S, De Angelis M, Novellino E, Nacci V, Belinskaya T, Saxena A, Campiani G. 2006. Discovery of huperzine A-tacrine hybrids as potent inhibitors of human cholinesterases targeting their midgorge recognition sites. *J Med Chem.*, 49: 3421-3425.

Gottfries CG. 1988. Alzheimer's disease. A critical review. *Compr Gerontol C.*, 2: 47-62.

Graef S, Schönknecht P, Sabri O, Hegerl U. 2011. Cholinergic receptor subtypes and their role in cognition, emotion, and vigilance control: an overview of preclinical and clinical findings. *Psychopharmacol. (Berlin)*, 215: 205-229.

Grammas P. 2011. Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 8: 26-26.

Granger DN, Kubes P. 1996. Nitric oxide as antiinflammatory agent. *Methods Enzymol.*, 269: 434-442.

Graves AB, van Duijn CM, Chandra V, Fratiglioni L, Heyman A, Jorm AF, Kokmen E, Kondo K, Mortimer JA, Rocca WA. 1991. Alcohol and tobacco consumption as risk factors for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int J Epidemiol.*, 20 (Suppl. 2): 48-57.

Gravitz L. 2011. Drugs: a tangled web of targets. *Nature.* 475: 9-11.

Greenlee W, Clader J, Asberom T, McCombie S, Ford J, Guzik H, Kozlowski J, Li S, Liu C, Lowe D, Vice S, Zhao H, Zhou G, Billard W, Binch H, Crosby R, Duffy R, Lachowicz J, Coffin V, Watkins R, Ruperto V, Strader C, Taylor L, Cox K. 2001. Muscarinic agonists and antagonists in the treatment of Alzheimer's disease. *Farmaco.*, 56: 247-250.

Gregory KJ, Sexton PM, Christopoulos A. 2007. Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Neuropharmacol.*, 5: 157-167.

Haass C. 1999. Biology of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*, 249: 265.

Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB et al. 1992. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359: 322-225.

Hardy J, Allsop D. 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.*, 12: 383-388.

Hasselmo ME. 2006. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol.*, 16: 710-715.

Hasselmo ME, McGaughy J. 2004. High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation. *Prog Brain Res.*, 145: 207-231.

Heckmann M, Dudel J. 2007. Erregungsleitung und synaptische Übertragung. In: *Physiologie des Menschen*, 30. Aufl. Hrsg.: Schmidt RF, Lang F. Springer, Heidelberg, 80-110.

Herholz K. 2003. PET studies in dementia. *Ann Nucl Med.*, 17: 79-89.

Hodges H. 1996. Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Brain Res Cogn Brain Res.*, 3: 167-181.

Holtzman DM, Morris JC, Goate AM. 2011. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med.*, 3: 77sr1.

Humpel C. 2011. Chronic mild cerebrovascular dysfunction as a cause for Alzheimer's disease? *Exp Gerontol.*, 46: 225-232.

Ikeda T, Yamada M. 2010. [Risk factors for Alzheimer's disease]. *Brain Nerve*, 62: 679-690.

Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. 2010. Tau in Alzheimer disease and related taupathies. *Curr Alzheimer Res.*, 7: 656-664.

Ishii M, Kurachi Y. 2006. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des.*, 12: 3573-3581.

Jacobs HI, Van Boxtel MP, Van der Elst W, Burgmans S, Smeets F, Gronenschild EH, Verhey FR, Uylings HB, Jolles. 2011. Increasing the diagnostic accuracy of medial temporal lobe atrophy in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*, 25: 477-490.

Jakubík J, Michal P, Machová E, Dolezal V. 2008. Importance and prospects for design of selective muscarinic agonists. *Physiol Res.*, 57 (Suppl. 3): 39-47.

Jekabsone A, Neher JJ, Borutaite V, Brown GC. 2007. Nitric oxide from neuronal nitric oxide synthase sensitises neurons to hypoxia-induced death via competitive inhibition of cytochrome oxidase. *J Neurochem.*, 103: 346-356.

Johnson G, Moore SW. 2006. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Curr Pharm Des.*, 12: 217-225.

Jones EG. 1986. Neurotransmitters in the cerebral cortex. *J Neurosurg.*, 65: 135-153.

Jones RW. 2003. Have cholinergic therapies reached their clinical boundary in Alzheimer's disease? *Int J Geriatr Psychiatry*, 18 (Suppl. 1): 7-13.

Jung BH, Jeon MJ, Bai SW. 2008. Hormone-dependent aging problems in women. *Yonsei Med J.*, 49: 345-351.

Kar S. 2002. Role of amyloid β peptides in the regulation of central cholinergic function and its relevance to Alzheimer's disease pathology. *Drug Dev Res.*, 56: 248-263.

Kar S, Slowikowski SP, Westaway D, Mount HT. 2004. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci.*, 29: 427-441.

Kawahara M. 2010. Neurotoxicity of β -amyloid protein: oligomerization, channel formation, and calcium dyshomeostasis. *Curr Pharm Des.*, 16: 2779-2789.

Kawas CH, Corrada MM. 2006. Alzheimer's and dementia in the oldest-old: a century of challenges. *Curr Alzheimer Res.*, 3: 411-419.

Keck T, White JA. 2009. Glycinergic inhibition in the hippocampus. *Rev Neurosci.*, 20: 13-22.

Khachaturian AS, Corcoran CD, Mayer LS, Zandi PP, Breitner JC, Cache County Study Investigators. 2004. Apolipoprotein E epsilon4 count affects age at onset of Alzheimer disease, but not lifetime susceptibility: The Cache County Study. *Arch Gen Psychiatry*, 61: 518-524.

Kleschyov AL, Oelze M, Daiber A, Huang Y, Mollnau H, Schulz E, Sydow K, Fichtlscherer B, Mülsch A, Münzel T. 2003. Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin? *Circ Res.*, 93: e104-112.

Klinkenberg I, Blokland A. 2010. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci Biobehav.*, 34: 1307-1350.

Knox LT, Jing Y, Fleete MS, Collie ND, Zhang H, Liu P. 2011. Scopolamine impairs behavioural function and arginine metabolism in the rat dentate gyrus. *Neuropharmacol.*, 61: 1452-1462.

Kowalska A. 2004. [The beta-amyloid cascade hypothesis: a sequence of events leading to neurodegeneration in Alzheimer's disease]. *Neurol Neurochir Pol.*, 38: 405-411.

Kriegelstein J. 2002. Pharmakotherapie der Demenz. Pharmakologie und therapeutische Wirksamkeit der Antidementiva. *Pharm Unserer Zeit*, 4: 362-369.

Kulstad JJ, Green PS, Cook DG, Watson GS, Reger MA, Baker LD, Plymate SR, Asthana S, Rhoads K, Mehta PD, Craft S. 2006. Differential modulation of plasma beta-amyloid by insulin in patients with Alzheimer disease. *Neurol.*, 66: 1506-1510.

Kuzuhara S. 2010. [Treatment strategy of Alzheimer's disease: pause in clinical trials of Abeta vaccine and next steps]. *Brain Nerve*, 62: 659-666.

Lane RM, Potkin SG, Enz A. 2006. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int J Neuropsychopharmacol.*, 9: 101-124.

Larsen JT, Hansen LL, Spigset O, Brøsen K. 1999. Fluvoxamine is a potent inhibitor of tacrine metabolism in vivo. *Eur J Clin Pharmacol.*, 55: 375-382.

Latscha HP, Kazmaier U, Klein HA. 2002. Stickstoff-Verbindungen In: *Organische Chemie: Chemie-Basiswissen II. 5. Aufl.* Springer, Heidelberg, 174-198.

Law A, Gauthier S, Quirion R. 2001. Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. *Brain Res Brain Res Rev.*, 35: 73-96.

Lee HG, Zhu X, Nunomura A, Perry G, Smith MA. 2006. Amyloid beta: the alternate hypothesis. *Curr Alzheimer Res.*, 3: 75-80.

Lee JS, Im DS, An YS, Hong JM, Gwag BJ, Joo IS. 2011. Chronic cerebral hypoperfusion in a mouse model of Alzheimer's disease: an additional contributing factor of cognitive impairment. *Neurosci Lett.*, 489: 84-88.

Leonard BE. 2004. Pharmacotherapy in the treatment of Alzheimer's disease: an update. *World Psychiatry*, 3: 84-88.

Lester DB, Rogers TD, Blaha CD. 2010. Acetylcholine-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther.*, 16: 137-162.

Letenneur L, Larrieu S, Barberger-Gateau P. 2004. Alcohol and tobacco consumption as risk factors of dementia: a review of epidemiological studies. *Bio-med Pharmacother.*, 58: 95-99.

Li CY, Wang H, Xue H, Carlier PR, Hui KM, Pang YP, Li ZW, Han YF. 1999. Bis(7)-tacrine, a novel dimeric AChE inhibitor, is a potent GABA(A) receptor antagonist. *Neuroreport*, 10: 795-800.

Li C, Carlier PR, Ren H, Kan KK, Hui K, Wang H, Li W, Li Z, Xiong K, Clement EC, Xue H, Liu X, Li M, Pang Y, Han Y. 2007. Alkylene tether-length dependent gamma-aminobutyric acid type A receptor competitive antagonism by tacrine dimers. *Neuropharmacol.*, 52: 436-443.

Li HB, Matsumoto K, Tohda M, Yamamoto M, Watanabe H. 1996. NMDA- but not AMPA-receptor antagonists augment scopolamine-induced spatial cognitive deficit of rats in a radial maze task. *Brain Res.*, 725: 268-271.

Liu C, Ding JM, Faiman LE, Gillette MU. 1997. Coupling of muscarinic cholinergic receptors and cGMP in nocturnal regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *J Neurosci.*, 17: 659-666.

Liu YW, Li CY, Luo JL, Li WM, Fu HJ, Lao YZ, Liu LJ, Pang YP, Chang DC, Li ZW, Peoples RW, Ai YX, Han YF. 2008. Bis(7)-tacrine prevents glutamate-induced excitotoxicity more potently than memantine by selectively inhibiting NMDA receptors. *Biochem Biophys Res Commun.*, 369: 1007-1011.

Luchsinger JA, Mayeux R. 2004. Dietary factors and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*, 3: 579-587.

Lüllmann H, Mohr K, Hein L. 2006. Vegetatives Nervensystem. In: *Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittel verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*, 16. Aufl., Thieme, Stuttgart/ New York, 70-107.

Maccioni RB, Farias G, Morales I, Navarette L. 2010. The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. *Arch Med Res.*, 41: 226-231.

Machado S, Cunha M, Minc D, Portella CE, Velasques B, Basile LF, Cagy M, Piedade R, Ribeiro P. 2009. Alzheimer's disease and implicit memory. *Arg Neuropsiquiatr.*, 67: 334-342.

Madden S, Woolf TF, Pool WF, Park BK. 1993. An investigation into the formation of stable, protein-reactive and cytotoxic metabolites from tacrine in vitro. Studies with human and rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol.*, 46: 13-20.

Maelicke A. 2000. Allosteric modulation of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.*, 1: 11-18.

Markou A, Duka T, Prelevic GM. 2005. Estrogens and brain function. *Hormones (Athens)*, 4: 9-17.

Martorana A, Esposito Z, Koch G. 2010. Beyond the cholinergic hypothesis: do current drugs work in Alzheimer's disease? *CNS Neurosci Ther.*, 16: 235-245.

McKenna MT, Proctor GR, Young LC, Harvey AL. 1997. Novel tacrine analogues for potential use against Alzheimer's disease: potent and selective acetylcholinesterase inhibitors and 5-HT uptake inhibitors. *J Med Chem.*, 40: 3516-3523.

Medina M. 2011. Recent developments in tau-based therapeutics for neurodegenerative diseases. *Recent Pat CNS Drug Discov.*, 6: 20-30.

Meng Q, Ru J, Zhang G, Shen C, Schmitmeier S, Bader A. 2007. Re-evaluation of tacrine hepatotoxicity using gel entrapped hepatocytes. *Toxicol Lett.*, 168: 140-147.

Messer WS Jr. 2004. Drugs that target muscarinic cholinergic receptors. In: *Cognitive Enhancing Drugs*. Hrsg.: Buccafusco J. Birkhäuser, Basel, 37-48.

Mishima K, Iwasaki K, Tsukikawa H, Matsumoto Y, Egashira N, Abe K, Egawa T, Fujiwara M. 2000. The scopolamine-induced impairment of spatial cognition parallels the acetylcholine release in the ventral hippocampus in rats. *Jpn J Pharmacol.*, 84: 163-173.

Moncaster JA, Pineda R, Moir RD, Lu S, Burton MA, Ghosh JG, Ericsson M, Soscia SJ, Mocofanescu A, Folkerth RD, Robb RM, Kuszak JR, Clark JI, Tanzi RE, Hunter DG, Goldstein LE. 2010. Alzheimer's disease amyloid-beta links lens and brain pathology in Down syndrome. *PLoS One*, 5: e10659.

Morales I, Farias G, Maccioni RB. 2010. Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation*, 17: 202-204.

Murakami Y, Ikenoya M, Matsumoto K, Li H, Watanabe H. 2000. Ameliorative effect of tacrine on spatial memory deficit in chronic two-vessel occluded rats is reversible and mediated by muscarinic M1 receptor stimulation. *Behav Brain Res.*, 109: 83-90.

Nemec K, Schubert-Zsilavecz M. 2002. Fortschritt ist dringend nötig! Neuentwicklungen bei den Antidementiva. *Pharm Unserer Zeit*, 31: 376-380.

Neugroschl J, Sano M. 2010. Current and recent clinical research in Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.*, 77: 3-16.

Nirogi R, Mudigonda K, Kandikere V, Ponnamaneni R. 2010. Quantification of acetylcholine, an essential neurotransmitter, in brain microdialyses samples by liquid chromatography mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.*, 24: 39-48.

Nordberg A, Nilsson-Håkansson L, Adem A, Lai Z, Winblad B. 1989. Multiple actions of THA on cholinergic neurotransmission in Alzheimer brains. *Prog Clin Biol Res.*, 317: 1169-1178.

Olton DS, Samuelson RJ. 1976. Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 2: 97-116.

Osseni RA, Debbasch C, Christen MO, Rat P, Warnet JM. 1999. Tacrine-induced Reactive Oxygen Species in a Human Liver Cell Line: The Role of Anethole Dithiolethione as a Scavenger. *Toxicol In Vitro*, 13: 683-688.

Pae HO, Kim HG, Paik YS, Paik SG, Kim YM, Oh GS, Chung HT. 2000. Nitric oxide protects murine embryonic liver cells (BNL CL.2) from cytotoxicity induced by glucose deprivation. *Pharmacol Toxicol.*, 86: 140-144.

Pajouhesh H, Lenz GR. 2005. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx.*, 2: 541-553.

Pákási M, Kálmán J. 2008. Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.*, 53: 103-111.

Pakpour B, Ahmadi S, Nayer-Nouri T, Oryan S, Zarrindast MR. 2010. Inhibitory avoidance memory deficit induced by scopolamine: interaction with glutamatergic system in the nucleus accumbens. *Behav Pharmacol.*, 21: 719-726.

Pang YP, Quiram P, Jelacic T, Hong F, Brimijoin S. 1996. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J Biol Chem.*, 271: 23646-23649.

Panula P, Rinne J, Kuokkanen K, Eriksson KS, Sallmen T, Kalimo H, Relja M. 1998. Neuronal histamine deficit in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 82: 993-997.

Pardridge WM. Drug delivery to the brain. 1997. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 17: 713-731.

Pardridge WM. 2003. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Interv.*, 3: 90-105.

Paris D, Town T, Parker TA, Tan J, Humphrey J, Crawford F, Mullan M. 1999. Inhibition of Alzheimer's beta-amyloid induced vasoactivity and proinflammatory response in microglia by a cGMP-dependent mechanism. *Exp Neurol.*, 157: 211-221.

Pei JJ, Sjögren M, Winblad B. 2008. Neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease: from molecular mechanisms to identification of drug targets. *Curr Opin Psychiatry*, 21: 555-561.

Pepeu G, Giovanni MG. 2010. Cholinesterase inhibitors and memory. *Chem Biol Interact.*, 187: 403-408.

Perry EK, Smith CJ, Court JA, Bonham JR, Rodway M, Atack JR. 1988. Interaction of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroaminoacridine (THA) with human cortical nicotinic and muscarinic receptor binding in vitro. *Neurosci Lett.*, 91: 211-216.

Pi R, Mao X, Chao X, Cheng Z, Liu M, Duan X, Ye M, Chen X, Mei Z, Liu P, Li W, Han Y. 2012. Tacrine-6-ferulic acid, a novel multifunctional dimer, inhibits amyloid- β -mediated Alzheimer's disease-associated pathogenesis in vitro and in vivo. *PLoS One*, 7: e31921.

Pike VW. 2009. PET radiotracers: crossing the blood-brain barrier and surviving metabolism. *Trends Pharmacol Sci.*, 30: 431-440.

Pimplikar SW, Nixon RA, Robakis NK, Shen J, Tsai LH. 2010. Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci.*, 30: 14946-14954.

Pohanka M. 2011. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc*, 155: 219-229.

Pomponi M, Marta M, Colella A, Sacchi S, Patamia M, Gatta F, Capone F, Oliverio A, Pavone F. 1997. Studies on a new series of THA analogues: effects of the aromatic residues that line the gorge of AChE. *FEBS Lett.*, 409: 155-160.

Proctor GR, Harvey AL. 2000. Synthesis of tacrine analogues and their structure-activity relationships. *Curr Med Chem.*, 7: 295-302.

Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O. 2008. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci.*, 28: 14537-14545.

Qiu WQ, Folstein MF. 2006. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging*, 27: 190-198.

Ragozzino ME, Artis S, Singh A, Twose TM, Beck JE, Messer WS Jr. 2012. The selective M1 muscarinic cholinergic agonist CDD-0102A enhances working memory and cognitive flexibility. *J Pharmacol Exp Ther.*, 340: 588-594.

Rattray M. 2001. Is there nicotinic modulation of nerve growth factor? Implications for cholinergic therapies in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, 49: 185-193.

Redka DS, Pisterzi LF, Wells JW. 2008. Binding of orthosteric ligands to the allosteric site of the M(2) muscarinic cholinergic receptor. *Mol Pharmacol.*, 74: 834-843.

Reisberg B, Ferris SH, Kluger A, Franssen E, Wegiel J, de Leon MJ. 2008. Mild cognitive impairment (MCI): a historical perspective. *Int Psychogeriatr.*, 20: 18-31.

Renner UD, Oertel R, Kirch W. 2005. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical use. *Ther Drug Monit.*, 27: 655-665.

Rho JM, Storey TW. 2001. Molecular ontogeny of major neurotransmitter receptor systems in the mammalian central nervous system: norepinephrine, dopamine, serotonin, acetylcholine, and glycine. *J Child Neurol.*, 16: 271-281.

Riekkinen P Jr, Ikonen S, Aura J, Riekkinen M. 1999. Tetrahydroaminoacridine and D-cycloserine fail to alleviate the water maze spatial navigation defect induced by hippocampal inactivation. *Eur J Pharmacol.*, 366: 13-18.

Rosenthal TC, Khotianov N. 2003. Managing Alzheimer dementia tomorrow. *J Am Board Fam Pract.*, 16: 423-434.

Ruitenbergh A, van Swieten JC, Wittemann JC, Mehta KM, van Duijn CM, Hofman A, Breteler MM. 2002. Alcohol consumption and risk of dementia: the Rotterdam Study. *Lancet*, 359: 281-286.

Rukkumani R, Aruna K, Suresh Varma P, Padmanabhan Menon V. 2004. Hepatoprotective role of ferulic acid: a dose-dependent study. *J Med Food*, 7: 456-461.

S3-Leitlinie "Demenzen" der Deutschen Gesellschaft für Neurologie/ Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde. 2009.

Salawu FK, Umar JT, Olokoba AB. 2011. Alzheimer's disease: a review of recent developments. *Ann Afr Med.*, 10: 73-79.

Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Grünblatt E, Riederer P, Hoyer S. 2009. Modeling sporadic Alzheimer's disease: the insulin resistant brain state generates multiple long-term morphobiological abnormalities including hyperphosphorylated tau protein and amyloid-beta. *J Alzheimers Dis.*, 18: 729-750.

Sarter M, Bruno JP, Givens B. 2003. Attentional functions of cortical cholinergic inputs: what does it mean for learning and memory? *Neurobiol Learn Mem.*, 80: 245-256.

Savini L, Campiani G, Gaeta A, Pellerano C, Fattorusso C, Chiasserini L, Fedorko JM, Saxena A. 2001. Novel and potent tacrine-related hetero- and homobivalent ligands for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Bioorg Med Chem Lett.*, 11: 1779-1782.

Saxena A, Fedorko JM, Vinayaka CR, Medhekar R, Radić Z, Taylor P, Lockridge O, Doctor BP. 2003. Aromatic amino-acid residues at the active and peripheral anionic sites control the binding of E2020 (Aricept) to cholinesterases. *Eur J Biochem.*, 270: 4447-4458.

Schaeffer EL, Gattaz WF. 2008. Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A2 enzyme. *Psychopharmacol. (Berlin)*, 198: 1-27.

Schliebs R, Arendt T. 2006. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm.*, 113: 1625-1644.

Seltzer B. 2006. Cholinesterase inhibitors in the clinical management of Alzheimer's disease: importance of early and persistent treatment. *J Int Med Res.*, 34: 339-347.

Shannon HE, Bemis KG, Hendrix JC, Ward JS. 1990. Interactions between scopolamine and muscarinic cholinergic agonists or cholinesterase inhibitors on spatial alternation performance in rats. *J Pharmacol Exp Ther.*, 255: 1071-1077.

Shannon HE, Bymaster FP, Calligaro DO, Greenwood B, Mitch CH, Sawyer BD, Ward JS, Wong DT, Olesen PH, Sheardown MJ. 1994. Xanomeline: a novel muscarinic receptor agonist with functional selectivity for M1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.*, 269: 271-281.

Shao D, Zou C, Luo C, Tang X, Li Y. 2004. Synthesis and evaluation of tacrine-E2020 hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem Lett.*, 14: 4639-4642.

Smith S, Dringenberg HC, Bennett BM, Thatcher GR, Reynolds JN. 2000. A novel nitrate ester reverses the cognitive impairment caused by scopolamine in the Morris water maze. *Neuroreport*, 11: 3883-3886.

Steiner H, Capell A, Leimer U, Haass C. 1999. Genes and mechanisms involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*, 249: 266-270.

Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. 2010. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist*, 16: 435-452.

Stokin GB, Goldstein LS. 2006. Axonal transport and Alzheimer's disease. *Annu Rev Biochem.*, 75: 607-627.

Struble RG, Ala T, Patrylo PR, Brewer GJ, Yan XX. 2010. Is brain amyloid production a cause or a result of dementia of the Alzheimer's type? *J Alzheimers Dis.*, 22: 393-399.

Sugisaki E, Fukushima Y, Tsukada M, Aihara T. 2011. Cholinergic modulation on spike timing-dependent plasticity in hippocampal CA1 network. *Neurosci.*, 192: 91-101.

Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. 2009. Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of Aβ pathogenesis. *Acta Neuropathol.*, 118: 131-150.

Summerfield SG, Stevens AJ, Cutler L, del Carmen Osuna M, Hammond B, Tang SP, Hersey A, Spalding DJ, Jeffrey P. 2006. Improving the in vitro prediction of in vivo central nervous system penetration: integrating permeabil-

ity, P-glycoprotein efflux, and free fractions in blood and brain. *J Pharmacol Exp Ther.*, 316: 1282-1290.

Sussman JL, Harel M, Frolov F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253: 872-879.

Svegliati-Baroni G, Saccomanno S, van Goor H, Jansen P, Benedetti A, Moshage H. 2001. Involvement of reactive oxygen species and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells. *Liver*, 21: 1-12.

Svensson AL, Zhang X, Nordberg A. 1996. Biphasic effect of tacrine on acetylcholine release in rat brain via M1 and M2 receptors. *Brain Res.*, 726: 207-212.

Szilagyi M, Lau WM. 1993. Interaction of tacrine at M1 and M2 cholinergic receptors in guinea pig brain. *Pharmacol.*, 47: 223-229

Takada-Takatori Y, Kume T, Izumi Y, Ohgi Y, Niidome T, Fujii T, Sugimoto H, Akaike A. 2009. Roles of nicotinic receptors in acetylcholinesterase inhibitor-induced neuroprotection and nicotinic receptor up-regulation. *Biol Pharm Bull.*, 32: 318-324.

Takuma K, Yan SS, Stern DM, Yamada K. 2005. Mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis in Alzheimer's disease. *J Pharmacol Sci.*, 97: 312-316.

Tan ZS, Beiser A, Vasan RS, Au R, Auerbach S, Kiel DP, Wolf PA, Seshadri S. 2008. Thyroid function and the risk of Alzheimer disease: the Framingham Study. *Arch Intern Med.*, 168: 1514-1520.

Telting-Diaz M, Lunte CE. 1993. Distribution of tacrine across the blood-brain barrier in awake, freely moving rats using in vivo microdialysis sampling. *Pharm Res.*, 10: 44-48.

Terry AV Jr, Buccafusco JJ. 2003. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther.*, 306: 821-827.

Thatcher GR, Bennett BM, Reynolds JN. 2005. Nitric oxide mimetic molecules as therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.*, 2: 171-182.

Toda N, Ayajiki K, Okamura T. 2009a. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances. *Pharmacol Rev.*, 61: 62-97.

Toda N, Ayajiki K, Okamura T. 2009b. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide in neurological disorders. *Can J Physiol Pharmacol.*, 87: 581-594.

Tränkle C, Dittmann A, Schulz U, Weyand O, Buller S, Jöhren K, Heller E, Birdsall NJ, Holzgrabe U, Ellis J, Höltje HD, Mohr K. 2005. Atypical muscarinic allosteric modulation: cooperativity between modulators and their atypical binding topology in muscarinic M2 and M2/M5 chimeric receptors. *Mol Pharmacol.*, 68: 1597-1610.

Tumiatti V, Minarini A, Bolognesi ML, Milelli A, Rosini M, Melchiorre C. 2010. Tacrine derivatives and Alzheimer's disease. *Curr Med Chem.*, 17: 1825-1838.

van de Pol LA, Hensel A, Barkhof F, Gertz HJ, Scheltens P, van der Flier WM. 2006. Hippocampal atrophy in Alzheimer disease: age matters. *Neurol.*, 66: 236-238.

Vanhanen M, Koivist K, Moilanen L, Helkala EL, Hänninen T, Soininen H, Kervinen K, Kesäniemi YA, Laakso M, Kuusisto J. 2006. Association of metabolic syndrome with Alzheimer disease: a population-based study. *Neurol.*, 67: 843-847.

Vetrivel KS, Zhang YW, Xu H, Thinakaran G. 2006. Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener.*, 1: 4.

Vogel T, Benetos A, Verreault R, Kaltenbach G, Kiesmann M, Berthel M. 2006. [Risk factors for Alzheimer: towards prevention?]. *Presse Med.*, 35: 1309-1316.

Volpicelli LA, Levey AI. 2004. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog Brain Res.*, 145: 59-66.

Wallace TL, Porter RH. 2011. Targeting the nicotinic $\alpha 7$ acetylcholine receptor to enhance cognition in disease. *Biochem Pharmacol.*, 82: 891-903.

Wang S, Wang R, Chen L, Bennett DA, Dickson DW, Wang DS. 2010a. Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain. *J Neurochem.*, 115: 47-57.

Wang X, Xing A, Xu C, Cai Q, Liu H, Li L. 2010b. Cerebrovascular hypoperfusion induces spatial memory impairment, synaptic changes, and amyloid- β oligomerization in rats. *J Alzheimers Dis.*, 21: 813-822.

Waterhouse RN. 2003. Determination of lipophilicity and its use as a predictor of blood-brain barrier penetration of molecular imaging agents. *Mol Imaging Biol.*, 5: 376-389.

Webber KM, Raina AK, Marlatt MW, Zhu X, Prat MI, Morelli L, Casadesus G, Perry G, Smith MA. 2005. The cell cycle in Alzheimer disease: a unique target for neuropharmacology. *Mech Ageing Dev.*, 126: 1019-1025.

Weis S. 1997. 1. Alois Alzheimer. In: *Handbuch Morbus Alzheimer Neurobiologie, Diagnose, Therapie*. Hrsg.: Weis S, Weber G.; Beltz Psychologie Verlags Union, Weinheim, 3-35.

Wess J. 2005. Allosteric binding sites on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.*, 68: 1506-1509.

Wessler I, Kirkpatrick CJ. 2008. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol.*, 154: 1558-1571.

Wirsching BA, Beninger RJ, Jhamandas K, Boegman RJ, El-Defrawy SR. 1984. Differential effects of scopolamine on working and reference memory of rats in the radial maze. *Pharmacol Biochem Behav.*, 20: 659-662.

Williamson J, Goldman J, Marder KS. 2009. Genetic aspects of Alzheimer disease. *Neurologist*, 15: 80-86.

Wimo A, Prince M. 2010. *World Alzheimer Report 2010: The global economic impact of dementia*. Alzheimer's Disease International (ADI). London, UK.

Wirths O, Bayer TA. 2009. Die modifizierte Amyloid-Hypothese der Alzheimer-Demenz - intraneuronales Abeta induziert Neurodegeneration. *Neuroforum*, 15: 76-82.

Wirths O, Multhaup G, Bayer TA. 2004. A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide - the first step of fatal cascade. *J Neurochem.*, 91: 513-520.

Xu LS, Yang LX, Hu WW, Yu X, Ma L, Liu LY, Wei EQ, Chen Z. 2005. Histamine ameliorates spatial memory deficits induced by MK-801 infusion into ventral hippocampus as evaluated by radial maze task in rats. *Acta Pharmacol Sin.*, 26: 1448-1453.

Yamamoto Y, Mikami A, Fujii Y, Kamei C. 2007. Effect of histamine on muscimol-induced working memory deficits in radial maze performance. *J Pharmacol Sci.*, 104: 252-257.

Yao Y, Chinnici C, Tang H, Trojanowski JQ, Lee VM, Praticò D. 2004. Brain inflammation and oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer-like brain amyloidosis. *J Neuroinflammation*, 1: 21.

Zhou L, Liu YW, Peoples RW, Yang M, Tian X, Ai YX, Pang YP, Li ZW, Han YF, Li CY. 2009. Mechanism of bis(7)-tacrine inhibition of GABA-activated current in cultured rat hippocampal neurons. *Neuropharmacol.*, 57: 33-40.

Zilka N, Ferenick M, Hulin I. 2006. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: protector or promotor? *Bratisl Lek Listy*, 107: 374-383.

10. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Univ.-Prof. Dr. Ch. Fleck, Frau Dr. D. Appenroth,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Michel Sachs

11. Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. Ch. Fleck für die Überlassung des Themas und die vielfältige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Bei Frau Dr. D. Appenroth bedanke ich mich für die gute Betreuung bei der Versuchsdurchführung und der Befundauswertung. Mein besonderes Augenmerk gilt dabei der außerordentlichen Geduld und stetigen Motivationskunst meiner beiden Mentoren, ohne die ich die Dissertation keinesfalls hätte abschließen können. Außerdem möchte ich mich bei Frau Annegret Berthold für die exzellente Zusammenarbeit und Unterstützung während der Durchführung meiner Versuche bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Frau Hölscher und Herrn Bär, deren Engagement während der Durchführung ihrer Arbeit seinesgleichen sucht.

Mandy und Jürgen - Ihr habt in schwierigen Zeiten oftmals für das notwendige Durchhaltevermögen gesorgt - vielen Dank dafür!

Ich möchte mich bei meinen Freunden dafür bedanken, dass sie stets zu mir halten, allzeit ein offenes Ohr für mich haben und über so manche meiner Eigenheiten hinwegsehen können. Madlen, Katharina, Kristin, Georg, Jens, Jörg, Kju, Martin, Ronny, René und Steffen - Euch an meiner Seite zu wissen, ist ein außerordentlich großes Geschenk und erfüllt mich mit sehr viel Stolz.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie. Dabei danke ich nicht zuletzt meinen lieben Eltern, die mich fortwährend auf meinem Weg begleitet und mir allezeit zur Seite gestanden haben. Ohne sie hätte ich so manche Herausforderung nicht bewältigen können.

Der größte Dank gilt meiner lieben Schwester Anna, die mir in gewisser Weise das Leben gerettet hat.

12. Lebenslauf

Name: Sachs

Vorname: Michel

Geburtsdatum: 04.10.1982

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1989-1993 Grundschule „Friedrich Schiller“ Zella-Mehlis
1993-1994 Staatliches Gymnasium Zella-Mehlis
1994-2001 Goetheschule Ilmenau, staatliches Gymnasium

Bundeswehr: 07/2001-03/2002 Militärkraftfahrer

Hochschulbildung: 10/2002-12/2008 Studium der Humanmedizin an der
Friedrich Schiller Universität Jena

Berufliche Tätigkeiten: seit 02/09 AiW am Zentralklinikum Suhl